

Kjemisk og biologisk karakterisering av ekstrakter fra blåbær, *Vaccinium myrtillus*.

Lise-Lotte Stange Bekkevold



Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Mai 2008

Kjemisk og biologisk karakterisering av ekstrakter fra
blåbær, *Vaccinium myrtillus*.

Hovedfagsoppgave for graden master i farmasi
Avdeling for Farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

Lise-Lotte Stange Bekkevold
Oslo, mai 2008

Veiledere:
Hilde Barsett
Torunn H. Aslaksen
Terje E. Michaelsen

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo og Folkehelseinstituttet.

Takk til...

- Min veileder Hilde Barsett for god faglig hjelp og veiledning.
- Torun Aslaksen for god hjelp og gode råd.
- Anette og Tone for trivelige stunder på lesesalen.
- Jon-Martin for lange telefonsamtaler med oppmuntrende ord. Du er best!
- Mamma og pappa for kjempe god støtte
- Veslemøy for god oppmuntring og forståelse for slitet
- Rose-Marie for nydelige middager siste uka før levering
- Siri Johannesen og Hege Christensen for god hjelp til CYP-testing
- Finn Tønnesen for utføring av GC-MS analyse
- Terje Michaelsen for mulighet til biologisk testing på Folkehelsa
- Rolf Hjelmstad for tillatelse til å anvende foto fra hans nettsted
- Og alle ansatte og medstudenter for et trivelig hovedfagsår!

Oslo, mai 2008

Lise-Lotte Stange Bekkevold

Innholdsfortegnelse

1.	Forkortelser.....	7
2.	Sammendrag	9
3.	Innledning	11
3.1	<i>Blåbær, Vaccinium myrtillus</i>	<i>11</i>
3.1.1	Botanisk beskrivelse.....	12
3.1.2	Utbredelse	13
3.1.3	Folkemedisinsk bruk	13
3.1.4	Innholdsstoffer	13
3.1.5	Farmakologiske egenskaper	14
3.1.6	Polysakkarider i blåbær.....	17
3.2	<i>Polysakkarider.....</i>	<i>18</i>
3.2.1	Generelt.....	18
3.2.2	Pektiner	18
3.2.3	Struktur og immunmodulerende aktivitet.....	22
3.2.4	Komplementsystemet	22
3.2.5	Makrofagaktivering.....	23
3.2.6	CYP metabolisme.....	24
4.	Oppgavens mål.....	26
5.	Metoder	27
5.1	<i>Preparering av plantematerialet</i>	<i>27</i>
5.2	<i>Generelle metoder</i>	<i>27</i>
5.2.1	Vannkvalitet	27
5.2.2	Innveiging	27
5.2.3	Sentrifugering.....	28
5.2.4	Absorbansmåling.....	28
5.2.5	Filtrering.....	28
5.2.6	Blanding av løsninger.....	28
5.2.7	Degassing/fjerning av luft	29
5.2.8	Volumreduksjon	29
5.2.9	Frysetørring	29
5.2.10	Syrevasking av glassutstyr.....	30

5.2.11	Fenol-svovelsyretest.....	30
5.2.12	Vask av dialyseslanger.....	32
5.2.13	Dialyse.....	33
5.3	<i>Rensing og isolering av polysakkarider.....</i>	<i>34</i>
5.3.1	Ekstraksjon.....	34
5.3.2	Rensing av 50 % etanolekstrakt på Amberlite XAD-7HP.....	38
5.3.3	Gelfiltrering.....	40
5.3.4	Ionebytterkromatografi.....	43
6.	Karbohydrat analyse.....	46
6.1	<i>Monosakkaridsammensetning.....</i>	<i>46</i>
6.1.1	Deteksjon og kvantifisering av AGPs med Yariv reagens.....	46
6.1.2	Metanolyse.....	48
6.1.3	TMS Derivatisering.....	49
6.1.4	Gasskromatografi.....	51
6.2	<i>Strukturbestemmelse.....</i>	<i>53</i>
6.2.1	Karboksyl reduksjon.....	53
6.2.2	Metylering.....	54
6.2.3	Hydrolyse.....	56
6.2.4	Reduksjon.....	57
6.2.5	Acetylering.....	58
6.2.6	GC-MS.....	60
6.3	<i>Biologisk aktivitet.....</i>	<i>61</i>
6.3.1	Komplementfikseringstesten.....	61
6.3.2	Mikrosomforsøk med Midazolam.....	65
6.3.3	Test for antimikrobiell aktivitet.....	68
6.3.4	Måling av NO-frigjøring fra makrofager.....	70
7.	Resultater og diskusjon.....	73
7.1	<i>Fraksjonering og isolering av polysakkarider.....</i>	<i>73</i>
7.1.1	Ekstraksjon.....	73
7.1.2	Fraksjonering av 50 % etanolekstraktet på Amberlite XAD-7HP.....	74
7.1.3	Separasjon av lavmolekylære- og høymolekylære polysakkarider på Bio Gel P-6.....	75
7.1.4	Separasjon av sure- og nøytrale polysakkarider på ANX Sepharose Fast Flow ionebytter.....	77
7.2	<i>Karbohydratanalyse.....</i>	<i>78</i>
7.2.1	Monosakkaridbestemmelse.....	78
7.2.2	Bestemmelse av bindingsforhold.....	80

7.2.3	Identifisering av type II arabinogalaktan strukturer med Yariv reagens.....	83
7.3	<i>Biologisk aktivitet</i>	84
7.3.1	Komplementfiksering.....	84
7.3.2	Makrofagaktivering.....	88
7.3.3	Blåbær som CYP3A4 hemmer – Et pilotprosjekt	89
7.3.4	Antimikrobiell aktivitet	90
8.	Konklusjon	92
	Kildeliste	93

1. Forkortelser

	Alfa posisjon, indikerer at –OH på C1 har samme posisjon som –OH på C6
Ac	Acetyl
AG-I	Arabinogalaktan-I
AG-II	Arabinogalaktan-II
AGP	Arabinogalaktanprotein
APC	Antigen presenterende celle
Ara	Arabinose
Ara _f	Arabinose på furanoseform
	Beta
BSA	Bovine Serum Albumine, bestanddel i Veronal/BSA-buffer
CMC	Carbodiimid
D	D-sukker
Da	Dalton
DCM	Diklormetan
DEAE	Diethylaminoetyl
DMSO	Dimetylsulfoksid
<i>f</i>	Furanoseform
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
FI	Farmasøytisk Institutt
FID	Flammeionisasjonsdetektor
g	gravitasjonskraft ved sentrifugering
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
Glc	Glukose
HG	Homogalakturonan
GlcA	Glukuronsyre
HMDS	Heksametyldisilasan
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
IFN	Interferon

IL	Interleukin
L	L-sukker
MAC	Membranangrepskompleks
Man	Mannose
Me	Metylgruppe
MS	Massespektrometer
Mw	Molekylvekt
N ₂	Nitrogen gass
NO	Nitrogenoksid
O	Oksygenatom
PMII	<i>Plantago Major</i> fraksjon II
RG-I	Rhamnogalakturonan type I
RG-II	Rhamnogalakturonan type II
Rha	Rhamnose
ROS	Reaktive oksygen species
rpm	Antall rotasjoner per minutt
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
TFA	Trifluoreddiksyre
TMCS	Trimetylklorasilan
TMS	TMCS + HMDS + Pyridin
TNF	Tumornekrosefaktor
Xyl	Xylose

2. Sammendrag

Den medisinske bruken av blåbær (*Vaccinium myrtillus*) har vært kjent i flere årtusener, og mange av de biologiske egenskapene er assosieret med antioksidant aktiviteten til antocyaninpigmentene. Hilz et al. (2005) var de første til å presentere en detaljert karakterisering av noen celleveggpolysakkarider i blåbær, men ellers er det gjort lite forskning på høymolekylære substanser i blåbær.

Pulveriserte bær ble ekstrahert med etanol 96 %, etanol 50 %, vann 50 °C og vann 100 °C. 50 % etanolekstraktet ble først fraksjonert på Amberlite XAD-7HP, og gav fraksjonene 50% Amb og 50% Met. Videre fraksjonering og isolering av ekstraktene på Bio-Gel P-6, og ANX Sepharose 4 Fast Flow ionebytter gav henholdsvis fraksjonene 50%BG, 50%Sur1, 50%Sur2 og 50%Sur3. De vandige ekstraktene ble også fraksjonert og isolert på Bio-Gel P-6, og ANX Sepharose 4 Fast Flow ionebytter og gav fraksjonene 50BG, 100BG, 50Sur1, 50Sur2, 50Sur3, 100Sur1, 100Sur2 og 100Sur3. Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av monosakkaridsammensetningen ble bestemt etter metanolyse, TMS-derivatisering og analyse på GC. Bindingsforholdene mellom monosakkaridene ble bestemt etter karboksylreduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og analyse på GC-MS. Utfelling med Yariv reagens ble brukt for å indikere tilstedeværelse av Arabinogalaktan type II. Biologisk aktivitet ble testet ved komplementfikseringstesten, måling av NO-frigjøring fra makrofager, hemming av CYP-metabolismen og antimikrobiell aktivitet.

Monosakkaridsammensetningen var typisk for pektiner og indikerte tilstedeværelse HG og AG. Dette stemte med analyse av bindingstypene og felling med Yariv-reagens som viste tilstedeværelse av RG-I områder på HG-kjeden med AG-II sidekjeder. Total mengde karbohydrater i fraksjonene varierte fra 54 til 100 %.

7 av 15 fraksjoner viste høyere komplementfikerende aktivitet enn standarden PMII. Aktiviteten økte etter fraksjonering og isolering på ionebytter. Et unntak var 50%Sur2, 50Sur2 og 100Sur2 som hadde lavere aktivitet enn utgangsmaterialet. 50%BG og 50Rå viste økt frigjøring av NO fra makrofager, og kan tyde på makrofagaktiverende egenskaper.

96% Rå, 50% Rå og 50% Met viste alle sterk hemming på midazolammetabolismen, og tyder på at lavmolekylære forbindelser i blåbær kan være potente hemmere av CYP3A4.

50% Met viste størst antibakteriell aktivitet, men mindre en positiv kontroll.

3. Innledning

3.1 Blåbær, *Vaccinium myrtillus*



Figur 3-1: *Vaccinium myrtillus* (Foto ©: Rolf Hjelmstad).

Blåbærenes opphav blir forklart i sagnet om gjetergutten og jomfru Maria:

”Det skjedde i de dager da jomfru Maria vandret på jorden. En dag møtte hun gjetergutten, sulten og skinnmager. Han klaget sin nød og spurte jomfruen så vakkert om hun ikke kunne la det vokse en nærende frukt på fjellet også, slik det gjorde nede i dalen. Da tok Maria en krans fra sitt hår og strødde den ut over hele fjellet og skogene med. Og fra den tid har det vært blåbær både i skog, li og fjell” (Myskja 2006).

Blåbær deles hovedsakelig inn i to hovedgrupper: skogsblåbær (*Vaccinium myrtillus*) og hageblåbær (*Vaccinium corymbosum*). Hageblåbær vokser vilt i Nord-Amerika på busker som kan bli opptil 5 meter høye. Bærene er større enn norske blåbær og har kun pigmenter i skinnet, og fruktkjøttet er hvitt eller grønnaktig. Det finnes i tillegg flere underarter av blåbær, og nye sorter dyrkes frem med mindre busker og større og søtere bær som har høyere

antioksidantinnhold. Tilgangen på både viltvoksende og dyrkede blåbær har skapt et nytt stort marked for kommersielt salg av blåbær, og bare i Norge importeres det tonnevis av blåbær hvert år (Kalt og Dufour 1997).

I England går *Vaccinium corymbosum* under navnet "blueberry", mens *Vaccinium myrtillus* går under navnet "bilberry", "huckleberry", "Hurtleberry" eller "Whortleberry" (Kalt og Dufour 1997). Når det i Norge snakkes om blåbær menes det som regel *Vaccinium myrtillus*, og det er denne arten som undersøkes i oppgaven.

Det latinske slektsnavnet *Vaccinium* stammer fra et oldtidsspråk som den romerske historikeren Plinius (23 – 79) brukte på lyngart. Myrtillus stammer sannsynligvis fra likheten mellom blåbær og myrt (*myrtus*) (Skard 2003).

3.1.1 Botanisk beskrivelse

Blåbær (*Vaccinium myrtillus*) tilhører lyngfamilien (*Ericaceae*), og blåbærbusken er en glatt og krypende busk som kan bli opptil 60 cm høy (Faarlund og Junding 1992). Den feller bladene når høsten kommer på samme måte som trærne. Blomstringen skjer i april-juni, med lysegrønne til rosa eller rødaktige urneformede blomster. Blomstene er tvekjønnet, og blir befruktet av både fluer, bier og sommerfugler. I begynnelsen av juli er de første bærene modne, men den store plukkesesongen starter ikke før en måned senere. Bærene er kulerunde, søte og spiselige. De er egentlig svarte, men på grunn av et vokslag ytterst ser de blå ut (Wiscmann 1993). Noen ganger forekommer bær uten dette vokslaget, og da er de glinsende svarte. I følge gammel overtro var det farlig å spise svarte blåbær. Det betydde nemlig at en bjørn, orm eller frosk hadde slikket eller kysset dem, og bærene fikk navn etter hvilket dyr som hadde slikket på dem (bjørnesleik, ormesleik eller grobær) (Skard 2003). Fruktkjøttet er fiolett. Busken har mange firkantete opprette stengler som holder seg grønne i mange år, mens bladene er lyse grønne, ovale, tannete og flate (Faarlund og Junding 1992).

3.1.2 Utbredelse

Blåbær finnes over hele Europa, i vest Asia og Rocy Mountains i Nord-Amerika. Blåbær liker seg best i sur, middels fuktig og lett sandete jord, og vokser både i skogen og på fjellet opp til 1700 moh. De mest velsmakende blåbærene finnes på åpne solrike steder. I Norge er blåbær det vanligste ville bærslaget, og er en av de plantene som dekker størst område (Faarlund og Sundvig 1992, Wischmann 1993 Morazzoni og Bombardelli 1996).

3.1.3 Folkemedisinsk bruk

De medisinske egenskapene til blåbær har vært kjent i flere årtusener, og allerede på 1100-tallet anbefalte St. Hildegard av Bingen bruk av blåbær for å forfremme menstruasjon. På 1600-tallet skrev Lonicerus at han anbefalte blåbær mot steiner i urinveiene, samt mot sykdom i galleblæren.

Den medisinske bruken av blåbær har hovedsakelig vært knyttet til synet og urinveiene. Uttrekk av bærene ble brukt ved blærekatarr og urinveisinfeksjoner, og det sies at piloter under 2. verdenskrig fikk blåbær for å bedre nattsynet.

Bærene har på grunn av deres astrigerende og antiseptiske egenskaper tradisjonelt også blitt brukt for behandling av diaré, dysenteri, hemoroider, gastrointestinale inflammasjoner og munninfeksjoner (Morazzoni og Bombardelli 1996).

For indianerne i Nord-Amerika var blåbær hellige, og ble kalt stjernebær. Både tørkede og ferske bær var en viktig del av kostholdet, mens avkok av blåbær tradisjonelt ble brukt som både hostestillende og blodrensende middel. Fødende kvinner fikk blåbær for å lindre fødselssmertene (Myskja 2006).

Blåbær kalles også skogens drue på grunn av det høye næringsinnholdet, og har vært et verdifullt kosttilskudd for mange (Skard 2003).

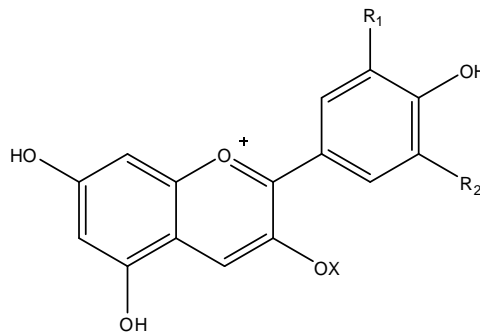
3.1.4 Innholdsstoffer

Blåfargen i blåbær kommer fra antocyaninene, som er den viktigste antioksidantkilden i blåbær. Antocyanin hører til flavonoidene, og består av et aglykon (antocyanidin) substituert med en eller flere sukkerenheter. I blåbær finnes antocyaniner særlig i det ytre skinnet og utgjør plantenes eget immunforsvar (Nohynek et al. 2006). Mengde antocyaniner i bærene

øker under modningsprosessen, og kan også variere i forhold til geografisk område. 14 forskjellige antocyaniner har blitt identifisert i blåbær, bestående av 5 typer antocyanidiner (se figur 3-2). Cyanidin finnes i høyest konsentrasjon, og utgjør nesten halvparten av det totale antocyanidin innholdet. Deretter kommer delfidin og petunidin, malvidin og peonidin (Burdulis et al. 2004).

Andre bestanddeler i blåbær inkluderer vitaminer, irridoider, terpen, tanniner (garvestoffer), andre flavonoider som quercetin og flavan-3-oler, stilbener (reservatrol), pektiner, organiske syrer og hydroksysinnamic- og hydroksybenzoesyrer (Morazzoni og Bombardelli 1995, E/S/C/O/P 2003).

Aglykon	R1	R2
Cyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Petunidin	OCH3	OH
Malvidin	OCH3	OCH3
Peonidin	OCH3	H



Figur 3-2: Strukturen til de vanligste aglykonene i *V. myrtillus*. X = glykosidenheten (3-O-arabinosid, 3-O-glucosid eller 3-O-galactosid) (Morazzoni og Bombardelli 1996).

3.1.5 Farmakologiske egenskaper

Mye forskning er gjort på blåbær, og mange av de biologiske egenskapene til blåbær assosieres med antioksidant aktiviteten til antocyanin pigmentene og andre polyfenoliske komponenter i blåbær (Burdulis et al. 2007).

I tillegg til polyfenolene, kan cellevegg polysakkaridene være verdifulle helsekomponenter, delvis på grunn av deres effekt som kostfiber (Hilz et al. 2005).

Antioksidanter og oksidativt stress

Antocyaniner fra blåbær er effektive antioksidanter og har vist seg å være potente fangere av frie radikaler, og retardere oksidasjon av humant LDL (low density lipoprotein) (E/S/C/O/P 2003).

Frie radikaler er forbindelser som dannes som et resultat av en normal oksidativ metabolisme. Dannes det flere frie radikaler enn antioksidantene klarer å nøytralisere, kan viktige komponenter i kroppen som lipider, proteiner og DNA skades, og tilstanden oksidativt stress kan etter hvert inntreffe. Oksidativt stress er nært knyttet til utvikling av sykdommer som kreft, AIDS, Alzheimers, inflammasjoner, magesår og hjerte-karsykdommer (Blomhoff 2004).

Antiinnflammatoriske egenskaper

Blåbær har antiinnflammatorisk effekt, og antas å spille en rolle i forebygging og behandling av kronisk inflammatoriske sykdommer. Transkripsjonsfaktoren NF- κ B aktiveres av oksidativt stress og andre pro-innflammatoriske faktorer, og kontrollerer transkripsjon av gener involvert i den inflammatoriske responsen. Antocyaniner isolert fra blåbær har vist seg å hemme aktivering av NF- κ B in vivo, og redusere plasmakonsentrasjonen av pro-innflammatoriske mediatorer slik at utviklingen av kroniske sykdommer retarderes (Karlsen et al. 2007).

I tillegg til å hemme aktivering av NF- κ B, har antocyaniner i blåbær vist seg å hemme proteolytiske enzymer som bryter ned kollagen, som er en av hovedbestanddelene i bindevevet (E/S/C/O/P 2003).

Blåbærs effekt på synet

Blåbær sies å ha god effekt på synet, men hypotesen om at antocyanosider fra *V. myrtillus* forbedrer nattsynet hos friske mennesker støttes ikke av kliniske studier. Mulige mekanismer for bedret syn inkluderer økt resyntese av rodopsin (synspurpur), modulering av retinal enzym aktivitet og økt kapillær mikrosirkulering (Canter og Ernst 2004).

Vasorelaksatorisk effekt

Flere studier tyder på at antocyaniner i blåbær har en vasorelaksatorisk effekt, og øker blodtilførselen til små kar. Dette kan være gunstig ved retinopati, som er en senkomplikasjon av diabetes, og andre sirkulatoriske lidelser som hemoroider og åreknuter (Heinrich et al. 2004).

Anti-plateaggregering

Antocyaniner i blåbær har vist seg å hemme aggregering av blodplater, og kan være med på å redusere risikoen for kardiovaskulære sykdommer (Morazzoni og Bombardelli 1996).

Antimikrobiell aktivitet

Blåbær har tradisjonelt blitt brukt mot infeksjoner i urinveiene og GI-trakten, og studier utført av Nohynek et al. (2006) viser at fenoliske komponenter i blåbær har en sterk hemming på både *Helicobacter Pylori*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus* (Nohynek et al. 2006).

E. coli er en vanlig årsak til urinveisinfeksjon (UVI), og bakteriene fester seg til urinveiene og blæreveggen hvor de koloniserer. Både blåbær og tranebær har vist seg å være effektive i behandling av UVI ved at de hindrer bakteriene i å binde seg til urinveiene, og dermed redusere infeksjonen (Kalt og Dufour 1997).

Bivirkninger/Forsiktighet

Toksisitets studier gjort på hunder og gnagere viser at ekstrakter av *V. myrtillus* er godt tolerert, og ingen negative effekter er rapportert (Canter og Ernst 2004).

Antocyaniner kan som nevnt hemme plateaggresjonen og føre til økt blødningsrisiko. Det bør derfor utvises forsiktighet ved samtidig bruk av antikoagulerende midler (E/S/C/O/P 2003).

3.1.6 Polysakkarider i blåbær.

Hilz et al. (2005) var de første til å presentere en karakterisering av celleveggpolysakkarider i *V. myrtillus*. Innholdet av cellevegg polysakkarider varierer i forskjellige vev i planten, og Hilz et al. delte derfor blåbæret inn i skinn, fruktkjøtt og frø.

I matindustrien blir mesteparten av blåbærene omgjort til juice, og store mengder presskake blir kastet. Polysakkaridinnholdet i juice og presskake ble i undersøkt for å se om presskake kan være en verdifull helsebringende kilde.

Celleveggmateriale ble ekstrahert med 70 % etanol, varm buffer, kalsium chelatorer og basiske løsninger. Monosakkaridanalyse av de ekstraherte fraksjonene viste at etanol ekstraktet inneholdt mye glukose og xylose, og frøene og fruktkjøttet inneholdt mye xylose i forhold til skinnet. Det varme buffer ekstraktet og kalsium chelator ekstraktet inneholdt mer enn 80 % galakturonsyre, som er en byggesten i homogalakturonan. Mesteparten av rhamnose ble funnet i det fortynnete base ekstraktet i tillegg til arabinose og galaktose. Dette indikerte tilstedeværelse av rhamnogalakturonan I. Det konsentrerte basiske ekstraktet inneholdt for det meste glukose og xylose.

Analyse av presskake og juice etter juice produksjon viste at mesteparten av celleveggpolysakkaridene (76 %) ble værende igjen i presskaka. (Hilz et al. 2005).

Bindingstypen mellom monosakkaridene ble også undersøkt, og både arabinogalaktan type I og arabinogalaktan type II var tilstede. Xylose, galaktose og fukose var tilstede som terminale sukre, som i kombinasjon med 1,4 og 1,4,6-bundet glukose indikerte tilstedeværelse av xyloglukaner (Hilz et al. 2005).

Hilz et al. (2006) beskriver også tilstedeværelsen av Rhamnogalakturonan II (RG-II) i celleveggmateriale fra blåbær, juice og presskake (Hilz et al. 2006).

3.2 Polysakkarider

3.2.1 Generelt

Polysakkarider er komplekse sukre og kan bestå av flere hundre monosakkaridenheter bundet sammen med glykosidbindinger. Polysakkaridene kan bestå av kun en type monosakkarid, eller av to eller flere typer, de kan være nøytrale eller sure, lineære eller forgrenet, og være substituert med forskjellige typer organiske grupper som metyl- og acetyl grupper.

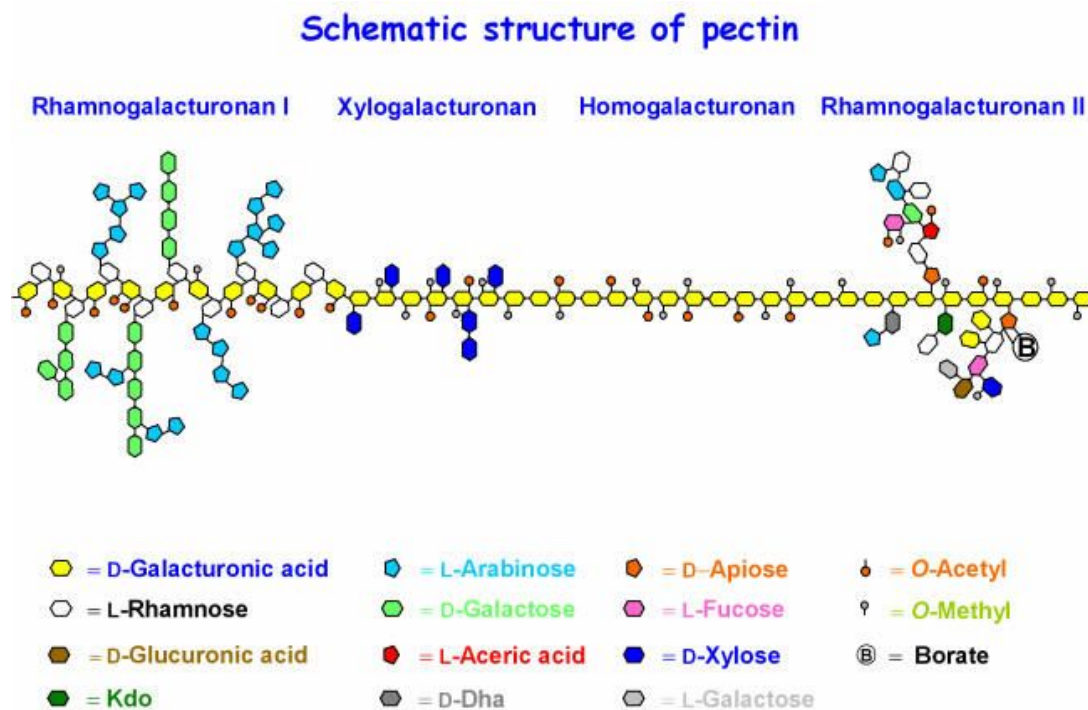
Polysakkarider som inneholder uronsyrer vil ha negative ladninger, og kalles for anioniske eller sure polysakkarider. Nøytrale polysakkarider inneholder kun nøytrale monosakkarider. Polysakkarider med biologisk aktivitet er ofte ladet fordi de inneholder uronsyrer, og forskjellige typer polysakkarider isolert fra planter brukt i tradisjonell medisin har vist seg å ha immunmodulerende effekt (Paulsen og Barsett 2005).

Plantecelleveggen består hovedsakelig av polysakkarider som cellulose, hemicellulose og pektin. Pektin kan frigjøres fra plantecelleveggen med vann eller kalsium chelatorer, mens hemicellulose og cellulose krever forskjellige konsentrasjoner av basiske løsninger for å frigjøres (Izydorczyk 2005).

3.2.2 Pektiner

Pektiner er en kompleks blanding av polysakkarider, og utgjør ca 1/3 av celleveggen hos høyere planter. Pektiner bidrar til mange av celleveggens funksjoner som cellestørrelse og form, porestørrelse, ionetransport, vann retensjon og de er også involvert i forsvarsmekanismer mot infeksjoner, sår og stress. Den relative mengden og strukturen til de forskjellige enhetene i et pektin molekyl avhenger av opphavet og utviklingsstadiet til plantematerialet samt funksjonen til celle - veggen som er involvert.

Pektiner består hovedsakelig av en homogalakturenan hovedkjede avbrutt av forgrenede rhamnogalakturenan områder som vist på figur 3-3. (Schols og Voragen 2002).



Figur 3-3: Skjematisk struktur av pektin (Scheller 2007).

Homogalakturonan

Homogalakturonan består av delvis esterifiserte α -1,4-bundet galakturonsyreenheter, og utgjør den såkalte ”glatte” regionen. Fordelingen av metyl- og acetyl-esterifisering på galakturonsyrehovedkjeden kan variere veldig, og resultere i forskjellige fysikalske egenskaper. Pektiners evne til å danne geler avhenger av deres esterifiseringsgrad og molekylstørrelse. Graden av metylesterifisering (DM) uttrykkes som antall mol av metanol tilstede per 100 mol galakturonsyre. Når DM er 50 eller høyere, kalles pektinene høy-metoksyl-pektiner (HM), og når DM er mindre enn 50 kalles pektinene lav-metoksyl-pektiner (LM). Homogalakturonan kan også være substituert med xylose enheter bundet til posisjon 3 på galakturonsyreenhetene (Schols og Voragen 2002).

Rhamnogalakturonan I

Rhamnogalakturonan I (RG-I) består av vekslende α -1,4-bundet D-galakturonsyre og α -1,2-bundet L-rhamnose enheter, høyt substituert med arabinan, galaktan og arabinogalaktan

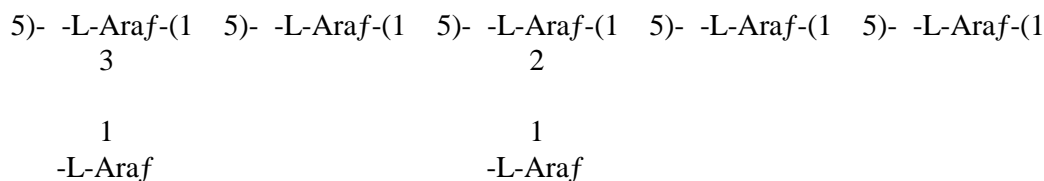
sidekjeder bundet til posisjon 4 på rhamnose. Arabinogalaktaner bundet til rhamnose enhetene er oftest AG-II, men AG-I kan også forekomme. Dette høyt forgrenede området utgjør den såkalte "hårete" regionen til pektinet (Schols og Voragen 2002).

Rhamnogalakturonan II

Rhamnogalakturonan (RG-II) utgjør kun en liten del av pektinet men har den mest komplekse strukturen som er kjent. RG-II består av 9-10 -1,4-bundet galakturonsyreenheter med 4 sidekjeder bestående av et antall uvanlige og derfor lett gjenkjennelige sukkerenheter som apiose, 3-deoxy-D-mannon-octulonsic acid (KDO), 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (DHA), 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose (aceric acid), 2-O-metylxylose og 2-O-metylfucose, i tillegg til mer vanlige monosakkarider som arabinose, rhamnose og fucose. I celleveggen er galakturonsyre hovedkjeden uesterifisert når RG-II er lokalisert nær plasmamembranen, og esterifisert når RG-II befinner seg i primærceleveggen. RG-II kan danne en dimer ved at to apioser kryssbindes av en 1:2 borat-diol ester (Hilz et al. 2006).

Arabinaner

Arabinaner består hovedsakelig av en hovedkjede med -1,5-bundet L-arabinofuranosyl enheter som i naturlig form er substituert med -arabinofuranosyl enheter i posisjon 2 og/eller 3. Arabinaner kan ha en molekylvekt opptil 10 kDa og er ofte kovalent bundet til polymere rike på galakturonsyreenheter (Paulsen og Barsett 2005).

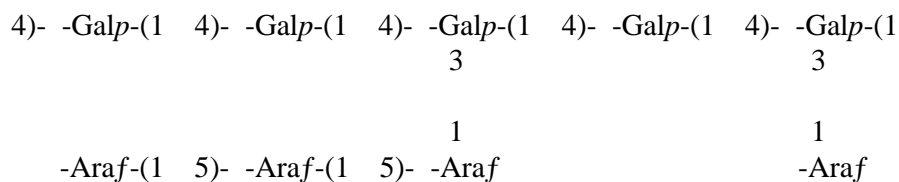


Figur 3-4: Foreslått struktur for en del av arabinan (Paulsen og Barsett 2005).

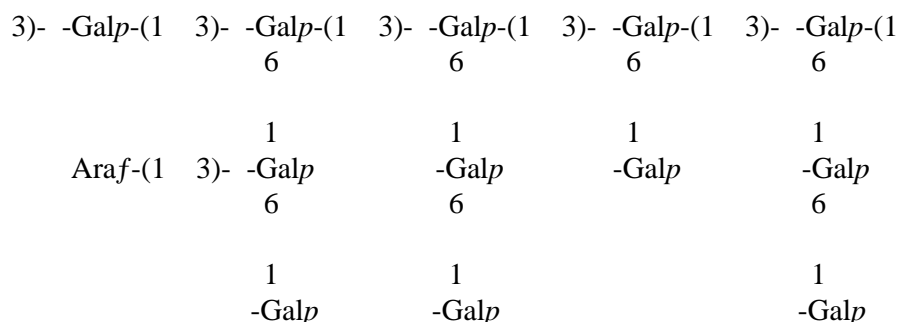
Arabinogalaktaner

Arabinogalaktaner består hovedsakelig av arabinose og galaktose enheter, og klassifiseres i to grupper; arabinogalaktan type I (AG-I) og arabinogalaktan type II (AG-II) (figur).

Arabinogalaktan I:



Arabinogalaktan II:



Figur 3-5: Arabinogalaktan type I og arabinogalaktan type II (Modifisert figur fra Sveaas 2007).

AG-I består av -1,4-bundet D-galaktan hovedkjede med sidekjeder av 1,3-bundet arabinose.

AG-II består av -1,3-bundet D-galaktan hovedkjede, høyt forgrenet med 1,6-bundet galaktose enheter. Arabinaner er 1,3-bundet til galaktose.

Begge typene kan være tilstede som sidekjeder i pektin eller som enkle polymere, og både AG-I og AG-II finnes som bestanddeler av RG-I komplekset 1,4-bundet til rhamnose enhetene. AG-II kan i tillegg være tilstede som sidekjeder på et protein segment, og refereres til som arabinogalaktanproteiner (AGPs) (Izydorczyk 2005).

En enkel måte å skille mellom AG-I og AG-II er deres evne til å felle ut med en Yariv reagens. Kun AG-II har mulighet til å danne et rødt bunnfall med Yariv, og testen kan brukes til å påvise AG-II i bioaktive polymere (Paulsen og Barsett 2005).

Pektiner har vist seg å ha flere farmakologiske egenskaper som både kolesterolsenkende, immunstimulerende, anti-metastatisk, sårhelende og anti-nevrologisk (Paulsen og Barsett 2005).

3.2.3 Struktur og immunmodulerende aktivitet

Detaljerte strukturelle studier avslører at hårete områder av pektiner er viktige for biologisk aktivitet. Strukturer som ser ut til å være viktige for aktivering av komplementsystemet inneholder hovedkjeder med rhamnogalakturon I og arabinogalaktan II sidekjeder. Ikke alle pektintype-polymere har nødvendigvis biologisk aktivitet, og det er tydelig at noen spesifikke strukturelle aspekter må være tilstede. Størrelsen til strukturene ser ut til å være viktig, og mye tyder på at strukturen må ha mer enn ett bindingssete for å være aktiv (Paulsen og Barsett 2005).

3.2.4 Komplementsystemet

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunsystemet, og det medfødte immunsystemet må aktiveres før det spesifikke immunsystemet med B- og T-celler kan bli aktivert. Komplementsystemet er et kaskadesystem, som består av 20 forskjellige plasmaproteiner produsert i leveren, og før det aktiveres sirkulerer vanligvis komplementproteinene i blodet i en inaktiv form.

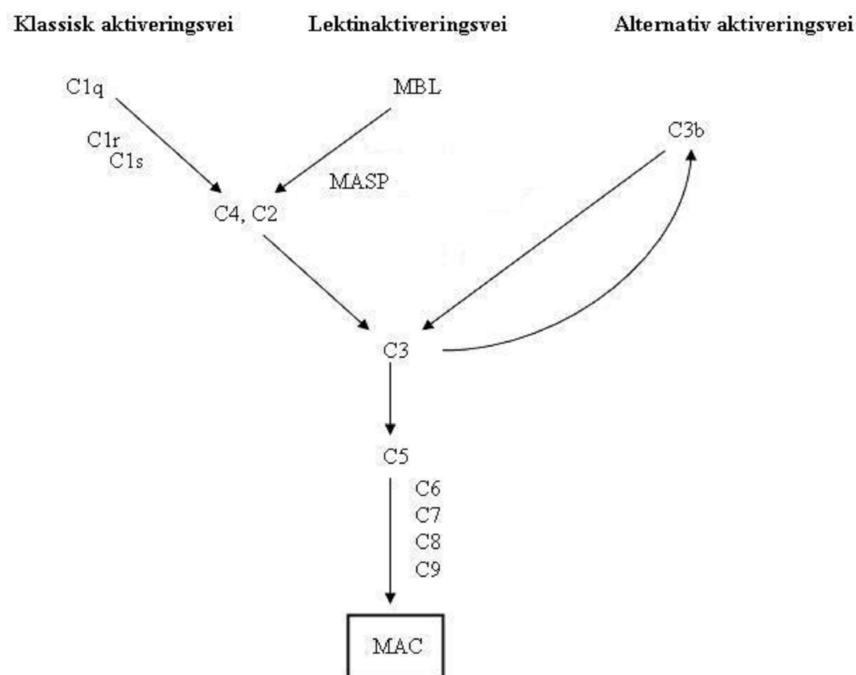
Aktivering av komplementsystemet initierer en rekke enzymatiske reaksjoner hvor proteolytisk bryting og aktivering av komplementkomponenter fører til kovalent binding av komplementfragmenter på patogenoverflaten. Fagocytter har overflateresptorer som gjenkjenner disse fragmentene, og letter opptak og ødeleggelse av patogenet.

Komplementsystemet kan aktiveres via tre forskjellige veier (se figur 3-6):

- Den klassiske veien
- Den alternative veien
- Mannosebindene lektin veien

Antistoff bundet til antigen på patogenoverflaten aktiverer komplement via den klassiske veien, mens den alternative veien aktiveres ved direkte kontakt med en mikrobiell overflate. Lektin veien aktiveres ved binding av plasmaproteiner (mannose bindende lektin) til peptidoglykaner på mikrobielle overflater.

Selv om de tre veiene for komplementaktivering trigges forskjellig, ender alle veiene i den samme reaksjonen hvor komplement komponenten C3 spaltes i C3a og C3b, hvor C3b kovalent bindes til overflaten på patogenet. Binding av C3b er den viktigste funksjonen til komplementsystemet, og kalles for komplementfiksering. C3b merker patogenet for fagocytose, samtidig som det dannes proteinkomplekser som fører til dannelse av membran attakk kompleks (MAC) som ødelegger patogenets cellemembran ved lyse (Parham 2004, Michaelsen 2007).



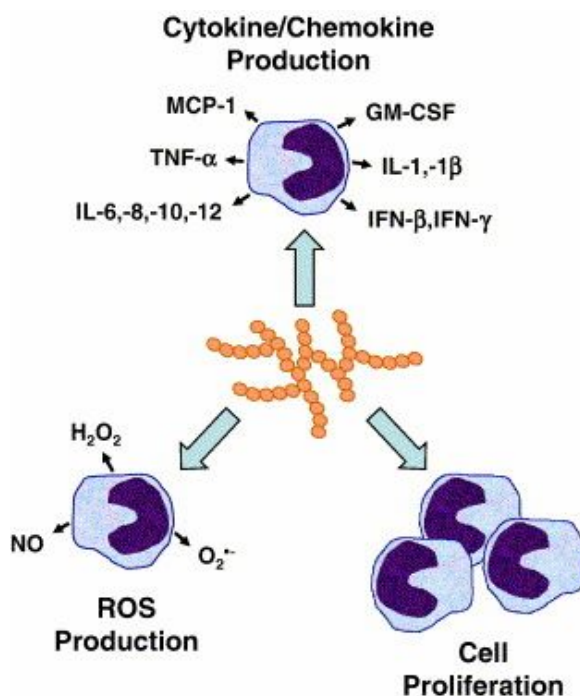
Figur 3-6: Aktivering av komplementsystemet via den klassisk veien, den alternative veien og via lektin veien.

3.2.5 Makrofagaktivering

Når et patogen invaderer humane vev, er makrofagen den første effektor cellen i immunsystemet den møter. Makrofager er den modne formen av sirkulerende monocytter som har forlatt blodbanen og bosatt seg i vevene hvor de differensierer videre, blir større og endrer egenskaper. Navnet makrofag betyr stor fagocytt, og er godt egnet for fagocytose av bakterier. I tillegg er makrofager gode antigen presenterende celler (APC), og bidrar til det spesifikke immunsystemet ved å presentere antigener for T_H1-celler (T-hjelpeceller). T_H1-

cellene virker tilbake på makrofagene ved å skille ut cytokiner som øker deres fagocytterende evne (Parham 2004).

I tillegg til å aktivere komplementsystemet, aktiverer plantepolysakkarider også forskjellige makrofagresponser som vist på figur 3-7. Plantepolysakkarider binder til overflatereseptorer på makrofagene og aktiverer fagocytose, øker produksjon av ROS og NO samt sekresjon av cytokiner og kjemokiner som tumor nekrose faktor (TNF), interleukin (IL)-1 , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ og IFN- β (Schpetkin og Quinn 2005).



Figur 3-7: Plantepolysakkarider aktiverer forskjellige makrofagresponser. Forkortelser: IL; interleukin, IFN; interferon, TNF- ; tumor nekrose faktor , GM-CSF; granolytt/makrofag koloni-stimulerende faktor, MCP-1; monocytt kjemoattraktant protein-1, NO; nitrogenoksid (Schpetkin og Quinn 2006).

3.2.6 CYP metabolisme

Mange legemidler er fettløselige, og for at de skal kunne skilles ut i nyrene må de metaboliseres til mer vannløselige substanser. Denne prosessen finner hovedsakelig sted i leveren, og det viktigste enzymesystemet for metabolisme av legemidler er cytokrom P-450 (CYP)-systemet. CYP-450 systemet består av en rekke enzymer hvor CYP-1A2, CYP-2B6, CYP-2C8, CYP-2C9, CYP-2C19, CYP-2D6 og CYP-3A4 er de mest sentrale i

metabolismen av legemidler. Aktiviteten av enzymene er i større eller mindre genetisk bestemt. Interaksjoner oppstår når et legemiddel, som påvirker aktiviteten til et av enzymene, tas sammen med et annet legemiddel som brytes ned av det samme enzymet. En rekke legemidler kan enten stimulere eller hemme metabolismen av andre legemidler. Ved å øke CYP-enzymenes aktivitet blir resultatet lavere konsentrasjon av de legemidlene som er substrater for samme enzym, og dermed redusert terapeutisk effekt. Enzyminduksjonen vil ikke inntreffe før etter noen dager, og være maksimal etter 1-2 uker. Ved å hemme aktiviteten til CYP-enzymene blir resultatet økt konsentrasjon av de legemidlene som er substrater for samme enzym. Enzymhemming inntreffer vanligvis momentant, i motsetning til enzyminduksjon. Det er ikke bare legemidler som kan påvirke aktiviteten til CYP-enzymene. Grapefrukt juice inneholder for eksempel substanser som hemmer CYP-3A4, og etter inntak stiger konsentrasjonen av legemidler som brytes ned av samme enzym. Konsentrasjonen kan øke så mye at det kan oppstå toksiske effekter av legemiddelet (Legemiddelhandboka 2007).

4. Oppgavens mål

Foreløpig er effekten av blåbær relatert til lavmolekylære fargestoffer med høy antioksidanteffekt, men man kan ikke si dette for sikkert da det er blitt utført få strukturstudier på høymolekylære substanser fra blåbær.

Målet med oppgaven er:

Å isolere forskjellige fraksjoner på grunnlag av størrelse og ladning, og utføre kjemisk og biologisk karakterisering av disse.

5. Metoder

5.1 Preparering av plantematerialet

1. Tørkede blåbær (*Myrtilli fructus*) ble kjøpt fra Apotekproduksjon A/S.
2. Bærene ble knust i morter, og tilsatt diklormetan for å fjerne lavmolekylære og upolare organiske stoffer.
3. Etter ca. 24 timer ble diklormetanen filtrert fra, og ny diklormetan tilsatt. Dette ble gjentatt 2 ganger.
4. Bærene ble satt til tørking i avtrekkskap 1 uke, men de tørket ikke.
5. 93 % etanol ble tilsatt for å trekke ut vannet av bærene, og etter 24 timer ble etanolen filtrert fra.
6. Bærene ble fryst ned på metanolbad (-40 °C) for at de skulle bli sprø og enklere å knuse i morter.
7. De knuste bærene ble satt til tørk i varmeskap (40 °C), og da ble de endelig tørre nok til å kunne pulveriseres med en mekanisk pulveriseringsmaskin.
8. Vekt pulverisert blåbær: 415 g.

5.2 Generelle metoder

5.2.1 Vannkvalitet

Alt vannet som ble brukt var destillert på Elix[®] millipore med Progard[®] 2 w/o polyfenol filter hvis ikke annet er spesifisert.

5.2.2 Innveiing

All innveiing ble utført på:

Analysevekt: BP 221S (Sartorius) (FI)

5.2.3 Sentrifugering

Løsninger ble sentrifugert i:

- Multifuge 4KR (Heraeus Sepatech) (FI)
- Megafuge 3.OR (Heraeus Sepatech) (FHI)

5.2.4 Absorbansmåling

- BIO-RAD mikroplatereader, model 3550 (FI)
- Thermo max mikroplateleser (FHI)

5.2.5 Filtrering

Filtrering av løsninger ble utført med:

- Glassfiberfilter: Whatman[®] 110 mm (Schleicher & Schuell)
- Membran filter: Millex[®] GP filter 0,22 µm (Millipore)
Durapore[®] GV filter 0,22 µm (Millipore)
Acro[®] 50A Filter Device with 5 µm Versapor[®] membrane, Non-sterile
(Life Sciences)

* Nutsj og vannstråleoppsats med Durapore[®] membran filter ble brukt til filtrering av større væskemengder, mens sprøyte med filterenhet ble brukt til filtrering av mindre mengder.

5.2.6 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet med:

- Whirlimixer (Fisons)
- MS2 Minishaker (IKA)

5.2.7 Degassing/fjerning av luft

Degassing av løsninger ble utført ved bruk av helium i ca. 15 minutter eller ved vakuum fra vannstrålepumpe.

5.2.8 Volumreduksjon

Løsninger ble dampet inn på rotavapor til ønsket konsentrasjon/mengde ved 40-50°C under vakuum.

- Rotavapor: RE (Büchi)

5.2.9 Frysetørking

Prinsipp:

Ved frysetørking fjernes vann fra frossen prøve ved sublimasjon under lavt trykk.

Utstyr:

- Rundkolbe
- Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød)
- Frysetørker: Alpha 1-4 (Christ[®])

Prosedyre:

1. Prøveløsning ble fryst ned i en rundkolbe under rotasjon i metanolbad ved - 40 °C.
2. Frosset prøve ble satt på frysetørkeren utvendig eller innvendig og satt under vakuum.
3. Prøvene ble frysetørket i ca. 24 timer.

5.2.10 Syrevasking av glassutstyr

Prinsipp:

Glassutstyr vaskes med konsentrert syre for å degradere eventuelle karbohydratforurensninger, som for eksempel cellulose, før analyse av karbohydrater. De spaltede polysakkaridene fjernes ved å vaske utstyret grundig med vann.

Ustyr:

- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)

Reagenser:

- Konsentrert HCl (Prolabo)

Prosedyre:

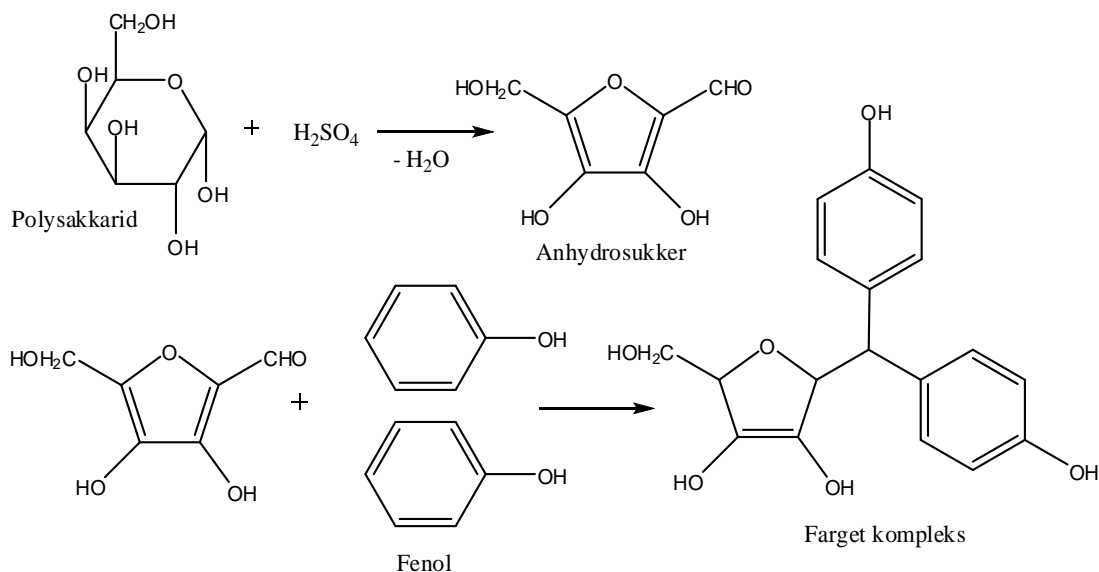
1. Alt glassutstyret ble dekket av konsentrert saltsyre i et stort begerglass, og satt til henstand i 30 minutter.
2. Glassutstyret ble skylt grundig i springvann og så i destillert vann.
3. Glassutstyret ble tørket i varmeskap på 80 °C til alt utstyret var tørt.

5.2.11 Fenol-svovelsyretest

(Dubois et al. 1956)

Prinsipp:

Fenol-svovelsyretesten brukes for å teste mengde karbohydratinnhold i en prøve. Konsentrert svovelsyre hydrolyserer polysakkaridene, og de resulterende monosakkaridene blir gjort om til furfuraldehyd (anhydrosukker). Furfuraldehydet kondenserer med to fenolmolekyler til et stabilt gulfarget kompleks som absorberer lys ved 490 nm. Intensiteten av gulfargen ved konstant fenolkonsentrasjon er proporsjonal med mengde karbohydrat i prøven.



Figur 5-1: Reaksjon mellom et monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som kondenserer med to fenolmolekyler til et stabilt gulfarget kompleks (Inngjerdingen 2000).

Utstyr:

- Glassrør, 5 ml
- Pipette, 100 μl (Gilson Microman)
- Finnpipette, 40-200 μl
- Microtest plate 96, flatbunnet (Sarstedt)
- Microplatereader: modell 3550 (BIO-RAD)
- Whirlimixer (Fisons)

Reagenser:

- Fenol 4 % (aq) (Merck)
- Konsentrert svovelsyre, H_2SO_4 (Merck)

Prosedyre:

1. 100 μl eluat ble overført til hvert sitt glassrør.
2. 200 μl 4 % fenol og 1 ml konsentrert H_2SO_4 ble tilsatt glassrøret, og mikset godt.
3. Etter henstand i romtemperatur i $\frac{1}{2}$ time ble løsningen mikset på nytt, og 100 μl fra hvert rør ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. (referanseløsning 100 μl destillert vann)

4. Absorbansen ble målt ved 490 nm, og plottet mot eluert volum fra kolonne.

5.2.12 Vask av dialyseslanger

Prinsipp:

Dialyseslangene ble vasket før bruk for å fjerne eventuelle rester av cellulose.

Utstyr:

- Dialyseslanger: Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane MWCO 3,5 Da d:29 mm og d: 1,5 mm
- Kokeplate/magnetrører: RCT basic (IKA Labortechnik)
- Begerglass, 5 l
- Magnet

Reagenser:

- 2 % NaOH (aq) (AnalaR)
- 0,05 % NaN₃ (aq) (Merck)

Prosedyre:

1. Dialyseslangene ble klippet i ønsket lengde (ca 1 meter).
2. Slangene ble vasket godt i springvann og deretter destillert vann, både utvendig og innvendig.
3. Slangene ble overført til 2 % kokende NaOH, og kokt i 10 minutter.
4. Slangene ble skylt i springvann og deretter destillert vann før de på nytt ble kokt i destillert vann i 10 minutter.
5. Slangene ble oppbevart i 0,05 % NaN₃ i kjøleskap for å forhindre bakterievekst.

5.2.13 Dialyse

Prinsipp:

Dialyse utføres for å fjerne uønskete lavmolekylære molekyler fra prøveløsningen. Molekyler med molekylvekt lavere enn dialyseslangenes cut-off verdi vil diffundere ut gjennom porene i slangene i en hastighet avhengig av den osmotiske gradienten. Det er derfor viktig å skifte vann ofte for å opprettholde den osmotiske gradienten.

Utstyr:

- Glasstaver
- Plastbøtte
- Dialyseslanger
- Dialyseklemmer
- Magnet og magnetrører

Reagenser:

- AgNO_3 (aq), mettet (Merck)

Prosedyre:

1. NaN_3 ble fjernet ved å legge slangene i destillert vann i 30 minutter.
2. Slangene ble lukket i den ene enden med en knute eller klemme, og litt destillert vann ble fylt i slangene for å sjekke om de var tette.
3. Slangene ble fylt ca $\frac{3}{4}$ fulle med prøveløsning.
4. Luft ble fjernet, og slangene forseglet med en klemme og en knute på toppen.
5. Prøvene ble dialysert i destillert vann under omrøring, og vannet ble skiftet 2-3 ganger i døgnet.
6. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av dialysevannet ikke lenger ble blakket av en dråpe AgNO_3 .

5.3 Fraksjonering og isolering av polysakkarider

5.3.1 Ekstraksjon

Ekstraksjon med 96 % etanol

Prinsipp:

Når plantematerialet ekstraheres med etanol fjernes upolare forbindelser og lavmolekylære organiske stoffer, som mineralsalter, fargestoffer, organiske syrer og eventuelt noen lavmolekylære karbohydrater fra plantematerialet som senere kan interferere med polysakkaridanalysene.

Utstyr:

Soxhletekstraktor koblet til tilbakeløpskjøler

Soxhletfilter

Varmemantel

2 liters rundkolbe

Reagenser:

- 96 % Etanol (Merck)



Figur 5-2: Oppsett for ekstraksjon på soxhlet.

Prosedyre:

1. 1 liter 96 % etanol ble tilsatt rundkolben, og halvparten av de pulveriserte blåbærene (ca. 200g) ble plassert i soxhletfilteret.
2. Prøvematerialet ble ekstrahert med etanol i et lukket system i 3 dager til ekstraktet var fargeløst. Systemet ble slått av om nettene.
3. Prøvematerialet ble satt til tørking i avtrekkskap natten over, og fryst ned.
4. Punkt 1-3 ble gjentatt med resten av prøvematerialet.
5. Etanolekstraktet ble senere oppkonsentrert på rotavapor, og konsentratet satt i fryseren for mulig senere testing.

Ekstraksjon med 50 % etanol

50 % etanol ekstraherer ut en del lavmolekylære, delvis polare substanser i tillegg til oligosakkarider og noen polysakkarider.

Utstyr:

- Varmemantel
- Rundkolbe tilkoblet tilbakeløpskjøler
- Kokestein

- Glassfiberfilter: Whatman[®] 110 mm (Sleicher & Schuell)
- Filtreringsutstyr tilkoblet vannsug

Reagenser:

- 50 % etanol (Merck)

Prosedyre:

1. Plantematerialet (ca 100 g) ble ekstrahert med 1 liter 50 % etanol i ca 1 time ved koking.
2. Etanolekstraktet ble filtrert gjennom glassfiberfilter på vannsug.
3. Punkt 1-3 ble gjentatt 12 ganger til ekstraktet var fargeløst.
4. Prøvematerialet ble satt til tørking i avtrekkskap natten over, og fryst ned.
5. Punkt 1-3 ble gjentatt 19 ganger med siste halvdel av prøvematerialet til ekstraktet var fargeløst.

Ekstraksjon med vann**Prinsipp:**

Polare forbindelser som polysakkarider ekstraheres fra plantematerialet (midtlamellen og primær cellevegg) med vann. Polysakkaridene har forskjellig løselighet i vann, og ved å variere temperaturen (50 °C og 100 °C) vil forskjellige polysakkarider gå i løsning. Ekstraksjonsevnen øker med økende temperatur. Polysakkarider som ekstraheres ut i vann, som beskrevet, er relativt lett bundet. Sure polysakkarider som ikke lar seg løse ved disse betingelsene må eventuelt løses med chelaterende agenter som frigjør polysakkarider bundet i celleveggen via kalsium.

Ekstraksjon med vann ved 50 °C**Utstyr:**

- Varmerplate og magnetrører: RCT basic (IKA Labortechnik)
- Magnet
- Stort begerglass, 4 l

-
- Termometer
 - Utstyr til filtrering med vannsug
 - Glassfiberfilter: Whatman[®] 110 mm (Schleicher & Schuell)
 - Sentrifuge: Multifuge 4KR (Heraeus) 400 omdreininger/min, 8 °C, 20 minutter

Prosedyre:

1. Restmaterialet etter ekstraksjon med 50 % etanol, ble ekstrahert med 3 liter destillert vann i et stort begerglass under omrøring på en magnetrører.
2. Plantematerialet ble ekstrahert ved 50 °C i ca. 1 time, og temperaturen ble hele tiden sjekket så den ikke skulle bli for høy.
3. Ekstraktet ble sentrifugert i 20 minutter.
4. Supernatanten ble filtrert gjennom glassfiberfilter på vannsug, dampet inn på rotavapor og konsentratet satt i fryseren for å unngå bakterievekst.
5. Punkt 1 – 4 ble gjentatt 3 ganger.

Ekstraksjon med vann ved 100 °C**Utstyr:**

- Varmemantel tilkoblet tilbakeløpskjøler
- Stor rundkolbe, 5 l
- Kokestein

Prosedyre:

1. Restmaterialet etter ekstraksjon med vann ved 50 °C, ble ekstrahert med 2 liter rensert vann i en stor rundkolbe ved 100 °C i ca. 1 time.
2. Ekstraktet ble sentrifugert i 20 minutter.
3. Vanneksraktet ble filtrert gjennom glassfiberfilter på vannsug, dampet på rotavapor og konsentratet satt i fryseren for å unngå bakterievekst.
4. Punkt 1 - 4 ble gjentatt 3 ganger.

5.3.2 Fraksjonering av 50 % etanolekstrakt på Amberlite XAD-7HP

(Sirnes 2003)

Prinsipp:

Amberlite XAD-7HP er en svak polar resin av akrylester som har en stor overflate, og fungerer som et adsorpsjonsmiddel (stasjonærfase). Mobilfasen kan enten være gass eller væske, men væske er mest brukt siden det er mer praktisk. For at separasjonen skal være vellykket er det avgjørende at stoffene har forskjellig affinitet til adsorpsjonsmiddelet, og at interaksjonene er reversible. Affiniteten skyldes krefter som dispersjon, dipol interaksjoner, hydrogenbindinger og svake kovalente bindinger. I arbeid med prøver som inneholder antocyaner (blåbær inneholder mye antocyaner) benyttes kolonnematerialet Amberlite XAD 7HP til å skille ut polare alifatiske forbindelser som lavmolekylære og høymolekylære karbohydrater. Antocyanene adsorberes til kolonnematerialet til de elueres ut med 0,1 % TFA i metanol.

Utstyr:

- Kolonne: Econo-Column[®] (BIO-RAD)
- Kolonnevolum: 100 ml
- Pakkemateriale: 100 g Amberlite XAD-7HP (Sigma)
- Partikkelstørrelse: 20-60 mesh, wet
- Glasspipette
- Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger)

Reagenser:

- Metanol (Merck)
- 0,1 % TFA i metanol (Pierce)
- Aceton:vann (70:30) (Merck)

Betingelser:

- Prøvemengde: 1g (78,2 mg/ml, 13 ml)
- Fraksjonsstørrelse: 10 ml

Prosedyre:**A. Pakking av kolonne**

1. Kolonnen ble pakket med 100 g Amberlite XAD-7HP pakkemateriale og 100 ml metanol.
2. Kolonnen ble deretter vasket med 500 ml metanol og 500 ml destillert vann. Det ble værende igjen en vannhøyde på ca. 0,5 cm over pakkematerialet.

B. Eluering

1. Prøven ble påført forsiktig med en glasspipette, og væsken som ble eluert ut mens prøven ble applisert på kolonnen, ble kastet.
2. De 5 første fraksjonene ble deretter eluert ut med ekstra lav elueringshastighet slik at prøven fikk tid til å interagere med kolonnematerialet.
3. Totalt 50 fraksjoner ble eluert ut og testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretesten (metode 5.2.12)
4. Da vanneluatet var fargeløst, ble kolonnen eluert med metanol til fargeløs løsning.
5. Deretter ble det eluert med 0,1 % TFA i metanol til fargeløs løsning (minst 200 ml).
6. Videre ble det eluert med aceton:vann til fargeløs løsning (minst 200 ml).
7. Det ble så vasket med 200 ml metanol.
8. Til slutt ble det vasket med 300 ml destillert vann.
9. Punkt 1 - 9 ble gjentatt 14 ganger.
10. Fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av karbohydratprofilen, dampet inn til et mindre volum på rotavapor (metode 5.2.8) og konsentrasjonen testet ved frysetørking (metode 5.2.9).

5.3.3 Gelfiltrering

Prinsipp:

(Greibrokk et al. 1998)

Gelfiltrering er en kromatografisk metode der stoffer, uavhengig av ladning, separeres etter deres molekylvekt og hydrodynamiske volum. Den stasjonære fasen består av et porøst pakkemateriale (gelmatriks) som har evne til å danne små porer. Molekyler som er løst i mobilfasen vil avhengig av størrelsen kunne trenge inn i disse porene. Store molekyler, som er for store til passere inn porene, føres ut med mobilfasen og elueres ut først med voidvolumet. Små molekyler vil avhengig av størrelse, ladning og diffusjonsevne trenge inn i porene, og det tar derfor lengre tid for dem å transporteres gjennom kolonnen. Molekylene elueres ut etter synkende molekylstørrelse. Gelaterialet finnes i flere forskjellige porestørrelser, og det er viktig å velge riktig gelmateriale som har egnet porestørrelse (eksklusjonsgrense) i forhold til de substansene som skal separeres på kolonnen.

Bio-Gel P-6 DG

(Bio-Rad Laboratories instruksjonshäfte)

Bio-Gel P geler er porøse polyakrylamid perler fremstilt ved kopolymerisering av akrylamid og N-N-metylenbisakrylamid. Bio-Gel P er ekstremt hydrofil og nesten fri for ladning, og sørger derfor for en effektiv gelfiltrering av ladede molekyler med tanke på størrelse. Fraksjoneringsområdet til gelen er 1000-6000 Daltons, og det gjør gelen velegnet til å separere de høymolekylære polysakkaridene fra salter og mindre molekyler i ekstraktene.

Utstyr:

- Kolonne: XK-50 (GE-Healthcare) d:5 cm, h:26 cm
- Kolonnevolum: ~500 ml
- Pakkemateriale: Bio-Gel[®] P-6 DG
- Partikkelstørrelse: 90–180 µm (medium)
- Fraksjoneringsområde: 1,000-6,000 Daltons
- Fraksjonssamler: Frac-920 (Amersham Biosciences)

-
- Pumpe: Peristaltic Pump P-1 (Pharmacia)
 - Mikrofilter: Acro[®] 50A Filter Device with 5 μ m Versapor[®] membrane, Non-sterile (Life Sciences)
 - Sprøyte: BD plastic (10 ml)
 - Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger)
 - Erlenmeyerkolbe med vakumrør

Reagenser:

- Elueringsmiddel: destillert vann (degasset med He-gass)
- Sukkerstandarder: Dextran T-500 (Mw ~ 500.000) (Pharmacia)
Raffinose (Mw ~ 600) (Sigma)

Betingelser:

- Elueringshastighet: 1 ml/min
- Fraksjoner: 10 ml per rør
- Prøvemengde: 100 ml

Prosedyre:**A. Pakking av kolonne**

1. 80 g tørr Bio-Gel ble veid ut og gradvis tilsatt 2 kolonnevolum destillert vann i en erlenmeyerkolbe egnet for vakuumsug, og satt til henstand i 12 timer i romtemperatur.
2. 2 kolonnevolum med destillert vann ble tilsatt, og pakkematerialet ble slemmet opp ved forsiktig rotering av erlenmeyerkolben.
3. Etter henstand og 90 – 95 % av partiklene hadde lagt seg, ble supernatanten dekantert av. Dette ble gjentatt 3 ganger for å fjerne over 90 % av de fine partiklene.
4. Siste gang ble halvparten av supernatanten dekantert av, og gelen ble degasset i 10 minutter på vannsug.
5. Pakkematerialet ble forsiktig helt oppi kolonnen for å unngå luftbobler.
6. For å få fullstendig pakking av kolonnen ble det eluert med destillert vann natten over.

B. Applisering og eluering

1. 25 mg Dextran og 50 mg Raffinose ble veid inn og løst i 100 ml destillert vann, applisert på kolonnen, eluert med destillert vann og samlet opp i 95 rør på fraksjonssamler.
2. Karbohydratinnholdet i fraksjonene fra standardløsningen ble bestemt ved fenol-svovelsyretesten (metode 5.2.11).
3. 100 ml prøveløsning ble filtrert, applisert på kolonnen, eluert med destillert vann og samlet opp i 95 rør på fraksjonssamler.
4. Kolonnen ble mellom hver prøveapplisering vasket med destillert vann i 24 timer.
5. Karbohydratinnholdet i fraksjonene ble testet med fenol-svovelsyretesten.
6. Fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av karbohydratinnhold, og satt i fryseren.

PD-10 Desaltings kolonne

(Amersham Pharmacia Biotech, instruksjonshefte)

Prinsipp:

PD-10 er ferdigpakke kolonner med Sephadex G-25 medium som benyttes til desalting av prøver.

Utstyr:

- Kolonne: PD-10 (GE-Healthcare) d:1,5 cm, h:5 cm
- Kolonnevolum: 8,3 ml
- Pakkemateriale: Sephadex G-25
- Partikkelstørrelse: 85 – 260 μm
- Fraksjoneringsområde: 1000-5000 Daltons
- Sprøyte: BD plastic (10 ml)
- Membranfilter: Millex[®] GP filter 0,22 μm (Millipore)

Prosedyre:

- Kolonnen ble først stilt i likevekt ved å dryppe gjennom 25 ml vann.
- Et totalt prøvevolum på 2,5 ml ble applisert på kolonnen.

- Høymolekylære komponenter i prøven ble eluert ut med 3 ml vann, og tatt vare på.
- Kolonnen ble vasket med 25 ml vann før applisering av neste prøve.

5.3.4 Ionebytterkromatografi

Prinsipp:

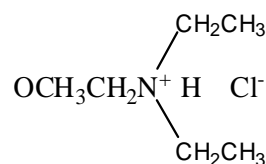
(Greibrokk et al. 1998)

Ionebytterkromatografi er basert på reversibel adsorpsjon av ladede molekyler til motsatt ladede ionebyttere. Det finnes både negativ og positive ionebyttere. Positiv ladede ionebyttere har negativt ladede motioner (anioner), og kalles derfor anionbyttere. Negativt ladede ionebyttere har positivt ladede motioner (kationer), og kalles derfor kationbyttere. Begge hovedgruppene kan i tillegg deles inn i sterke og svake ionebyttere, avhengig av syre-base styrken til den kovalent bundne gruppen. Det er kun benyttet anionbytter i denne oppgaven, og polysakkarider med negative ladninger adsorberes avhengig av deres affinitet for ionebytteren. Ionebytter kromatografi med bruk av diethylaminoetyl (DEAE) er spesielt passende for separering av nøytrale og sure polysakkarider. De nøytrale polysakkaridene passerer gjennom kolonnen uten å feste seg, mens de sure retarderes på kolonnen fordi de er negativt ladet, og kan elueres ut med buffer med økt ionestyrke eller pH.

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

(Amersham Pharmacia Biotech, instruksjonshefte)

ANX sepharose 4 Fast Flow (high sub) er en svak anionbytter basert på sterkt kryssbundet agarose (45-165 µm store agarosekuler) med diethylaminoetylgrupper (DEAE) bundet til seg. DEAE har positiv ladning og har klorid bundet til seg som motion.



Figur 5-3: DEAE med klorid som motion.

De negative kloridionene kan reversibelt byttes ut med andre ioner med samme ladning uten at matriksen endres. Ved applisering av prøvemateriale, vil negativt ladede grupper på polysakkaridene ta kloridionenes plass, og dermed retarderes på kolonnen. Nøytrale og positive ladede forbindelser elueres med vann uten forsinkelse. For å eluere de negative forbindelsene, benyttes en gradientløsning av NaCl. De retarderte stoffene elueres ut etter økende surhetsgrad ettersom konsentrasjonen av NaCl øker.

Utstyr:

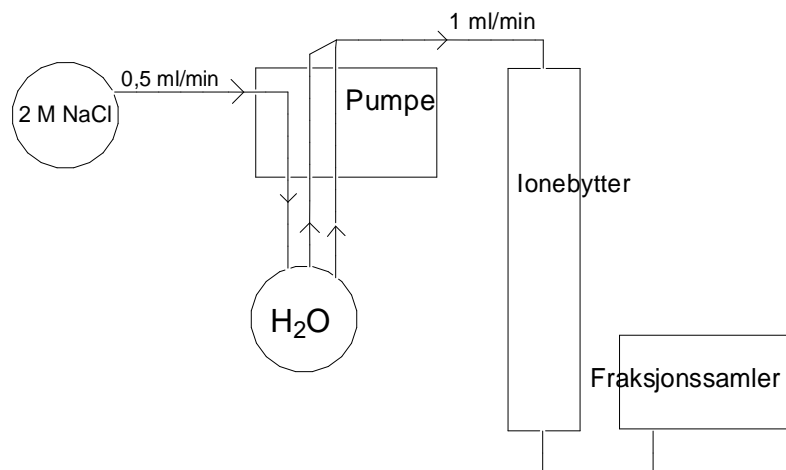
- Kolonne: XK-50 (GE-Healthcare) d:5 cm, h:26 cm,
- Kolonnevolum: ~ 500 ml
- Pakkemateriale: ANX Sepharose Fast flow (high sub)
- Pumpe: Perimax 4 kanaler (Spetec)
- Fraksjonsamler: LKB SuperFrac (Pharmacia)
- Erlenmeyerkolbe med vakumrør
- Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger)
- Sprøyte: BD plastic (50 ml)
- Mikrofilter: Acro[®] 50A Filter Device with 5 µm Versapor[®] membrane, Non-sterile (Life Sciences)

Reagenser:

- Destillert vann (degasset med He, metode 5.2.7)
- 2 M NaCl (aq) (Merck) (filtrert, metode 5.2.5)
- Mettet AgNO₃ (aq) (Merck)

Betingelser:

- Elueringshastighet: 1 ml/min
- Fraksjoner: 10 ml per rør
- Konsentrasjon prøve: 1,8 mg/ml
- Prøvemengde: 350 ml



Figur 5-4: Oppsett for generering av NaCl-gradient.

Prosedyre:

A. Pakking av kolonne

1. Pakkematerialet ble degasset ved hjelp av vannstrålepumpe, og forsiktig helt oppi kolonnen for å unngå luftbobler.
2. Destillert vann ble pumpet gjennom kolonnen for å fjerne etanolen fra pakkematerialet

B. Applisering og eluering

1. 350 ml prøveløsning ble filtrert og applisert på kolonnen.
2. De nøytrale molekylene ble eluert med 2 kolonnevolum destillert vann. Det første kolonnevolumet ble samlet opp og fryst ned.
3. De sure polysakkaridene ble eluert med en NaCl gradient (0-2 M), og samlet opp i 180 rør på fraksjonssamler.
4. Karbohydratinnholdet i fraksjonene fra standardløsningen ble bestemt ved fenol-svovelsyretesten (metode 5.2.11)
5. Fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av karbohydratinnhold, og satt i fryseren.
6. Kolonnen ble eluert med ett kolonnevolum NaCl, som ble tatt vare på.
7. Kolonnen ble til slutt vasket med destillert vann til 1 ml av eluatet ikke lenger ble blakket ved tilsetning av 2 dråper AgNO_3 .

6. Karbohydrat analyse

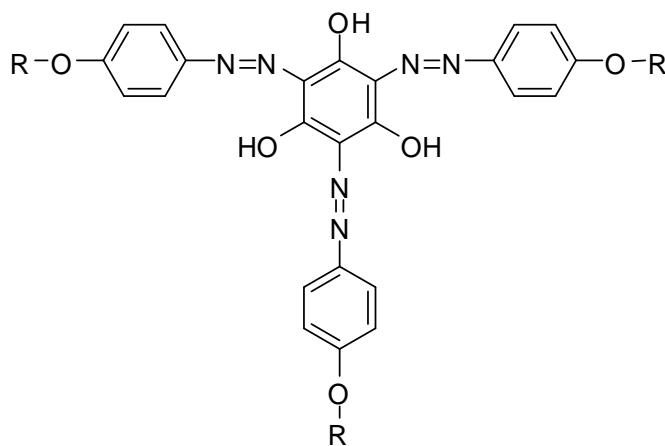
6.1 Monosakkaridsammensetning

6.1.1 Deteksjon og kvantifisering av AGPs med Yariv reagens.

(Holst et al. 1985)

Prinsipp:

Mengde arabinogalaktan-proteiner (AGPs) i plante ekstrakter kan kvantifiseres ved at prøven diffunderer ut i en agarose gel som inneholder Yariv reagens. Yariv reagens er et rødt fargestoff som spesifikt binder seg til AGPs, og hvis prøven inneholder AGPs, vil disse felle ut og danne røde ringer rundt brønnene. Denne metoden krever minimum 15 µg AGPs i prøven, og arabisk gummi brukes som standard referanse.



Figur 6-1: Yariv reagens. R = -D-glukosyl (Biosupplies 2008).

Utstyr:

- Plater: Gelbondfilm for agarose (GE healthcare)
- Kokeplate
- Utstyr til vannsug
- Kar med lokk

-
- Glassplater
 - Whatmanpapir
 - Cellepapir
 - 2,5 liters flaske

Reagenser:

- Prøvemateriale: 8 mg/ml
- Yariv reagens: -D-glukosyl Yariv reagens (1,3,5-tri-(4- -D-glucosopyranosyl phenyl-azo), 2 mg/ml (Biosupplies)
- Standard: Arabisk gummi (Acacia gum), 1 mg/ml
- Gel: (for en plate med 1 mm geltykkelse)
 - 35 mg agarosepulver (Bio-Rad)
 - 30 mg NaCl (s) (Prolabo)
 - 0,7 mg NaN₃ (Merck)
 - 3,5 ml destillert vann

Prosedyre:**A. Felling med Yariv reagens**

1. Gelbondfilm for agarose ble klippet ut, ca 5 x 7 cm.
2. Ingrediensene til gelen ble blandet, kokt opp og tilsatt 50 µl Yariv reagens.
3. Gelen ble blandet, og raskt helt utover den hydrofile siden på gelbondfilmen.
4. Da gelen hadde polymerisert (stivnet), ble det laget små brønner i den ved hjelp av vannsug.
5. Det ble applisert 2, 4 og 6 µl av standarden og hver prøve i hver sin brønn.
6. Platen ble lagt ned i et kar med fuktet filterpapir, og lukket igjen med lokk.
7. Gelen ble satt til henstand i 24 timer ved romtemperatur.

B. Pressing av plate

1. Platen ble lagt på en glassplatte med gelen opp.
2. Et stykke whatman papir ble klippet ut, fuktet og lagt over gelen.

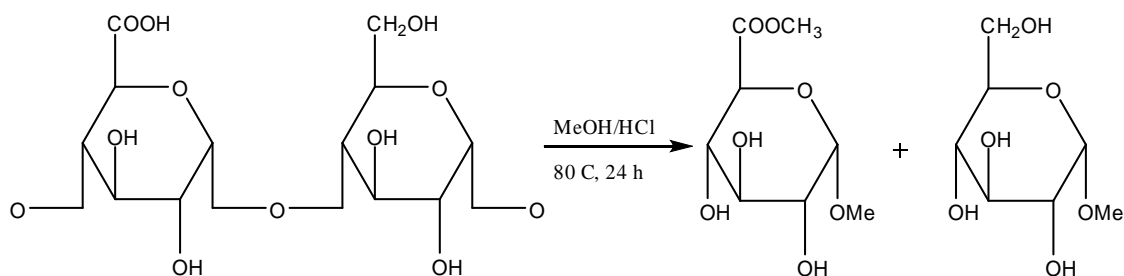
3. Ca. 10 cellepapir ble brettet dobbelt, og plassert over det våte whatmanpapiret.
4. En glassplate ble lagt over cellepapiret, og en 2,5 liters flaske med vann ble plassert oppå.
5. Etter ca. 10 minutter med pressing, ble cellepapiret snudd til den andre siden, og presset på nytt i 10 minutter.
6. Platene ble til slutt scannet inn på PC.

6.1.2 Metanolyse

(Chambers og Clamp 1971)

Prinsipp:

Metanolyse av polysakkarider utføres for å bryte glykosidbindingene mellom monosakkaridene. I et vannfritt miljø av syre og metanol, vil det dannes metylglykosid og metylester av COOH-gruppen ved C6 på uronsyrene ved forestring (figur..). Det er viktig at reaksjonen foregår i vannfritt miljø for å unngå at metylglykosidene hydrolyseres. Mannitol tilsettes som intern standard for å korrigere for eventuelle tap underveis.



Figur 6-2: Metanolyse av et surt polysakkarid til metylester og metylglykosid. (Inngjerdingen 2000).

Utstyr:

- Supelcorør (4 ml) med teflonbelagt skrukork
- SMI rør (blå)
- Brand Transferpettor pipette, 100 μ l
- Brand Transferpettor pipette, 200 μ l
- 5 ml glasspipette med peleusballong

Reagenser:

- 4 M HCl i MeOH (Merck)
- Intern standard: 1 µg/µl Mannitol (Sigma) i 1 M HCl i MeOH
- MeOH (vannfri) (Merck)

Prosedyre:

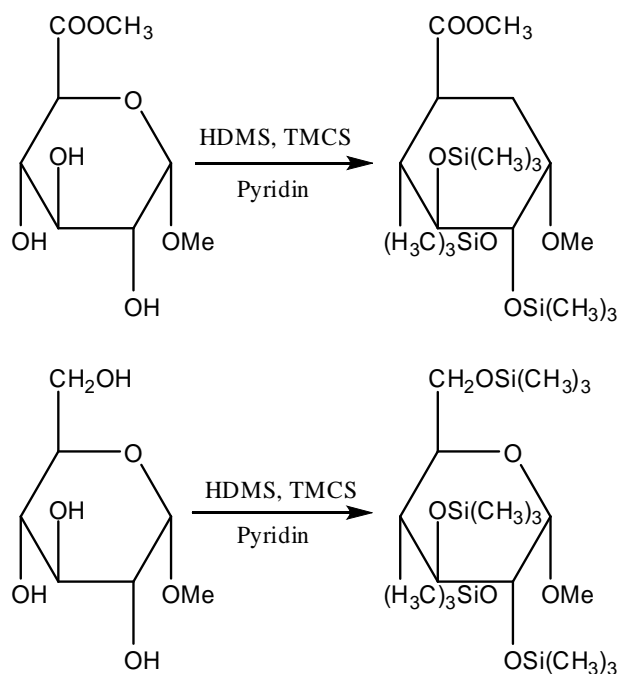
1. Alt glassutstyr ble syrevasket (metode 5.2.10).
2. 1 mg frysetørket plantemateriale ble veid inn i supelcorør, dekket med perforert parafilm og satt til tørking i en P₂O₅-vakuumsiktor i minimum 24 timer.
3. Prøvene ble tilsatt 1 ml 4 M HCl i MeOH og 100 µl mannitol som intern standard.
4. Prøvene ble satt i varmeskap ved 80 °C i 24 timer. Etter 15 minutter ble korkene etterskrudd for å forsikre at metanolen ikke fordampet.
5. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under N₂-gass.
6. 200 µl vannfri MeOH ble tilsatt prøvene, og dampet inn til tørrhet under N₂-gass.
7. Punkt 6 ble gjentatt 3 ganger.
8. Prøvene ble dekket med en perforert parafilm, og satt til tørking i en P₂O₅-eksikator i minimum 1 time før TMS-derivatisering (metode 6.1.3).

6.1.3 TMS Derivatisering

Prinsipp:

(Bjergaard og Rassmussen 2004)

Monosakkarider inneholder polare grupper, og har derfor dårlig flyktighet. Hensikten med derivatisering er å lage flyktige og termisk stabile derivater av stoffene slik at de blir bedre egnet for gasskromatografi. Under derivatiseringen reagerer frie hydroksylgrupper reagerer med Trimetylklorosilan og Hexametyldisilazan til permetylsilyleter (TMS-derivater). Pyridin anvendes som løsningsmiddel og katalysator.



Figur 6-3: Reaksjon mellom metylglykosid (med og uten metylestergruppe) og TMS reagens (Inngjerdingen 2000).

Utstyr:

- SMI rør (blå)
- Brand Transferpettor pipette, 200 µl
- Whirlimixer (Fisons)

Reagenser:

- TMS reagens: 1 ml Trimetylklorasilan (TMCS) (Supelco)
2 ml Heksametyldisilazan (Aldrich)
5 ml Pyridin (vannfri) (Merck)

Prosedyre:

1. Alt glassutstyr ble syrevasket (metode 5.2.10).
2. 200 µl TMS ble tilsatt prøven etter metanolyse (metode 6.1.2) og blandet godt.
3. Prøvene ble satt til henstand i minimum 30 minutter ved romtemperatur før analyse på GC.

6.1.4 Gasskromatografi

Prinsipp:

(Bjergaard og Rassmussen 2004)

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode for stoffer i gassform, og egner seg for stoffer som er flyktige og termisk stabile. Flyktigheten til stoffene er temperaturavhengige, og ved høyere temperatur blir stoffene mer flyktige. Stoffene separeres på bakgrunn av deres kokepunkt og interaksjon med stasjonærfasen. Stoffe som er lett flyktige analyseres ved lavere temperaturer enn stoffer som er mindre flyktige. Komponenter i prøveløsningen med høy affinitet for stasjonærfasen blir værende lenger på kolonnen enn komponenter med mindre affinitet for stasjonærfasen. Kolonnetemperaturen styres av et temperaturprogram.

Prøven injiseres i en oppvarmet injektor slik at den fordamper. 1 µl er et vanlig prøvevolum, som omdannes til ca. 1 ml gass i injektoren. For å unngå overbelastning av kolonnen kan det brukes en splittinjeksjon. Prinsippet for splittinjeksjon er at prøvegassen splittes opp slik at bare en liten del (1:6) av prøvevolumet bringes inn i kolonnen fra injektoren. Ved splittløs injeksjon bringes hele prøvevolumet inn i kolonnen.

I GC kalles mobilfasen for bæregass, og bæregassen virker som et transportmiddel for stoffene gjennom kolonnen. Helium foretrekkes som bæregass fordi den er sikrere i bruk enn hydrogen, og analysetiden reduseres med 40 % i forhold til nitrogen.

Kapillærkolonner er laget av silika, og er belagt med polyimid for å for å øke kolonnens holdbarhet. Kolonnene kalles for fused-silika-kolonner, og stasjonærfasen ligger som en tynn film på innsiden av kolonnen. 0,25 µm er en vanlig filmtykkelse på stasjonærfasen.

Flammeionisasjonsdetektoren (FID) er standarddetektor i de fleste GC-analyser, og måler elektrisk strøm fra ladede partikler (ioner og elektroner) som oppstår når organiske stoffer brenner i en flamme. Det er mengde ladede partikler som måles.

Hvert monosakkarid vil interagere forskjellig med stasjonærfasen, og danne forskjellige karakteristiske mønstre på kromatogrammet. Ved hjelp av retensjonstider, arealforhold, intern standard og standardkurver kan både kvalitativ og kvantitativ bestemmelse utføres.

Utstyr:

Gasskromatograf: Carlo Erba 6000 Vega Series 2.

Programmeringsenhet: ICU 600

Integrator: Shimadzu C-R6

Detektor: FID

Injektor: Splitt 1:6

Kolonne: DB-5 (J & W scientific) "Fused silica" kapillærkolonne

Lengde: 25 m

Indre diameter: 0,32 mm

Filmtykkelse: 0,25 μ m

Betingelser:

Bæregass: Helium

Injiseringsvolum: 1,0 μ l

Injektortemperatur: 260 °C

Detektortemperatur: 310 °C

Flow: Gjennom kolonna; 1,8 ml/min

Splitt flow; ~ 11 ml/min

	1 °C/min	6 °C/min
Temperaturprogram:	140 °C	170 °C
		250 °C

Prosedyre:

- Det ble injisert 1,0 μ l av den TMS-derivatiserte prøven (metode...).
- Sprøyten ble skylt 3 ganger med pyridin etter hver injeksjon, og hele programmet tok ca 60 minutter.

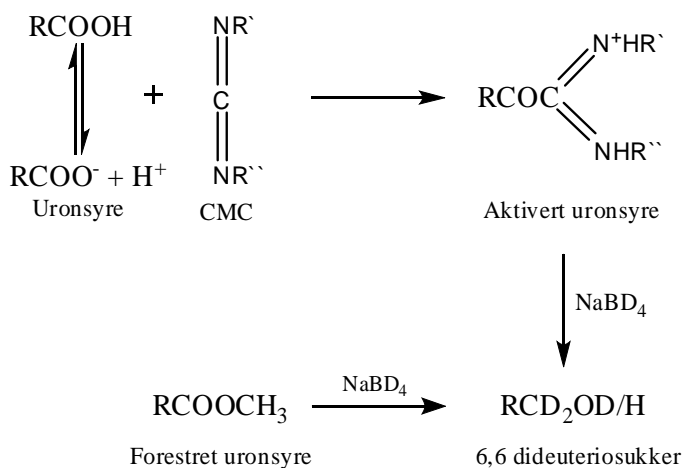
6.2 Strukturbestemmelse

6.2.1 Karboksyl reduksjon

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp:

Esterifiserte og frie karboksylsyregrupper på galakturonsyreenhetene må reduseres før metylering. Esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte med NaBD_4 til deutererte primære alkoholer, mens frie uronsyrer først må aktiveres med carbodiimid (CMC). Det dannes 6,6-dideuteriosukre som kan skilles fra nøytrale sukre i GC-MS fordi de vil ha fragmenter med molekylvekt ($M+2$).



Figur 6-4: Aktivering og reduksjon av fri uronsyre, og reduksjon av forestret uronsyre (Inngjerdningen 2000).

Utstyr:

- Rundkolbe, 25 ml
- Whirlimixer (Fisons)
- Knust is
- pH-papir (Merck)

Reagenser:

- 0,2 M MES (2-[N-Morfolino]etan sulfonsyre), pH 4,75 (Sigma)
- 500 mg/ml carbodiimid (1-sykloheksyl-3-(2-morfolinoetyl)-carbodiimid-meto-p-toluensulfonat) (Sigma)
- 2 M TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan), pH 9,0 (Sigma)
- 100 mg/ml NaBD₄ (Sigma Aldrich) i 0,05 M NaOH (AnalaR)
- Iseddik (Prolabo)

Prosedyre:

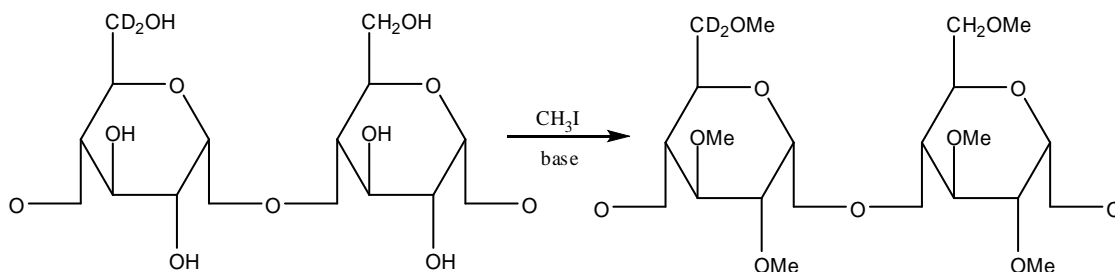
1. Alt glassutstyr ble syrevasket (metode 5.2.10).
2. 2 mg prøve ble løst i 1 ml vann, og deretter tilsatt 200 µl MES og 400 µl nylaget carbodiimidløsning.
3. Løsningen ble blandet godt og inkubert i 3 timer ved 30 °C.
4. 1 ml TRIZMA ble tilsatt, og prøven ble deretter avkjølt på is.
5. 1 ml nylaget NaBD₄-løsning ble tilsatt, og prøven ble inkubert over natten ved 4 °C.
6. Overskudd av reduktant ble fjernet ved å langsomt tilsette 500 µl (5 x 100 µl) iseddik.
7. Prøven ble rensset på PD10 kolonne (metode 5.3.3) og frysetørket (metode 5.2.9).

6.2.2 Metylering

(Ciucanu 2006)

Prinsipp:

Metylering er en vanlig derivatiseringsmetode for karbohydrater. Frie hydroksylgrupper i polysakkarider metyleres med metyliodid etter basekatalysert ionisering.



Figur 6-5: Metylering av OH-grupper (Inngjerdingen 2000).

Utstyr:

- Metyleringsrør med skrukork, 40 ml
 - Ristestativ: IKA-VIBRAX-VXR
 - Agatmorter og pistill
 - Ultralydbad: Bransonic 220
 - Whirlimixer (Fisons)
 - Sentrifuge: Multifuge 4KR (Heraeus Sepatech)
- speed: 1000 g, tid: 3 min

Reagenser:

- Dimetylsulfoksid (DMSO) (Merck)
- NaOH pellets, tørr (Merck)
- Metyliodid (Fluka)
- Kloroform (Prolabo)
- 100 mg/ml natriumtiosulfat (Merck) i destillert vann

Prosedyre:

1. Alt glassutstyr ble syrevasket (metode 5.2.10).
2. Den frysetørkede prøven fra karboksylreduksjonen (metode 6.2.1) ble tilsatt 1 ml DMSO.
3. Prøven ble satt til resting i 20 minutter for å løse sukrene, og prøver som var lite løselige i DMSO ble sonikert på ultralydbad.
4. Prøveløsningen ble overført til metyleringsrør.
5. NaOH-pellets ble revet i morter med DMSO (120 mg/ml ~ 2 pellets per ml DMSO).
6. 500 µl NaOH/DMSO-suspensjon ble tilsatt prøven uten å berøre glassveggen.

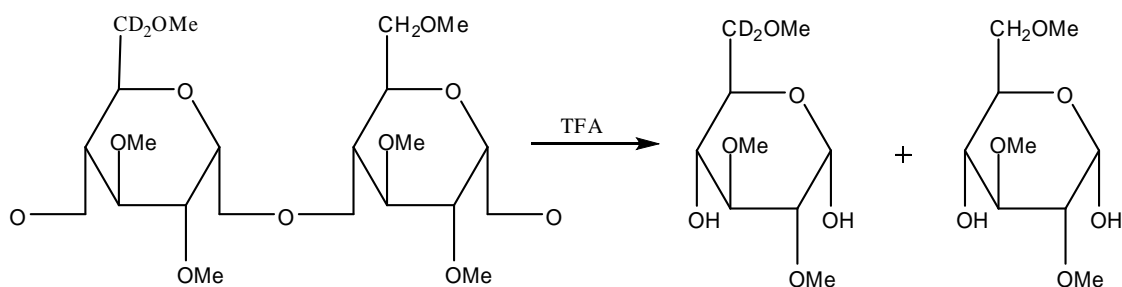
7. Prøven ble flushet med argon, og ristet i 30 minutter.
8. 100 μ l metyliodid ble tilsatt prøven, og ristet i 10 minutter.
9. Punkt 6 ble gjentatt.
10. 200 μ l metyljodid ble tilsatt prøven, og ristet i 20 minutter.
11. 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumtiosulfat i vann og 2 ml kloroform ble tilsatt prøven, og blandet godt.
12. For å separere fasene ble prøven sentrifugert.
13. Vannfasen (den øverste fasen) ble fjernet, og kloroform fasen ble vasket 5 ganger med 5 ml vann. Det ble sentrifugert mellom hver gang, og mellomsjiktet ble ikke tatt med.
14. Kloroform fasen ble tørket med N_2 -gass.

6.2.3 Hydrolyse

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp:

Metylerde polyakkarider spaltes til monosakkarider ved syrehydrolyse. TFA (trifluoreddiksyre) blir ofte brukt fordi den lett kan fjernes ved avdamping. Syre hydrolyse bryter kun de inter-glykoside bindingene, og lar metyl-eter bindingene være intakte.



Figur 6-6: Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA (Inngjerdningen 2000).

Utstyr:

- SMI rør (blå)
- Brand Transferpettor pipette, 100 μ l
- Brand Transferpettor pipette, 200 μ l
- Varmeskap: Functionline (Heraeus instruments)

Reagenser:

- 2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

Prosedyre:

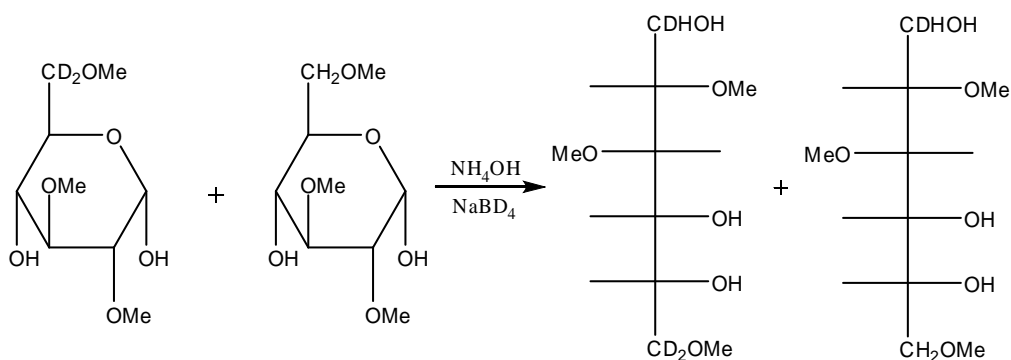
1. Alt glassutstyr ble syrevasket (metode 5.2.10).
2. Den metylerte prøven (fra metode 6.2.2) ble tilsatt 500 μ l TFA, og flushet med argon.
3. Prøven ble hydrolisert i varmeskap ved 100 °C i 2 timer.
4. Prøven ble avkjølt, og deretter dampet inn til tørrhet med N₂-gass.

6.2.4 Reduksjon

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp:

Ringstrukturen i monosakkaridene brytes ved at det sykliske hemiacetalet ved C1 reduseres med NaBD₄ under basiske forhold til alditol. NaBD₄ introduserer et deuterid atom ved C1 som vist på figur 6-7.



Figur 6-7: Reduksjon av karboksylsyre reduserte og hydrolyserte polysakkarider (Inngjerdingen 2000).

Utstyr:

- Ultralydbad: Branson 220
- Varmeskap: Functionline (Heraeus instruments)

- Finnpiquette, 200–1000 µl

Reagenser:

- 2 M NH_3 (Merck)
- 1 M NaBD_4 (Sigma Aldrich) nylaget i 2 M NH_3
- Iseddik (Prolabo)
- Metanol (Merck)
- 5 % eddiksyre i metanol

Prosedyre:

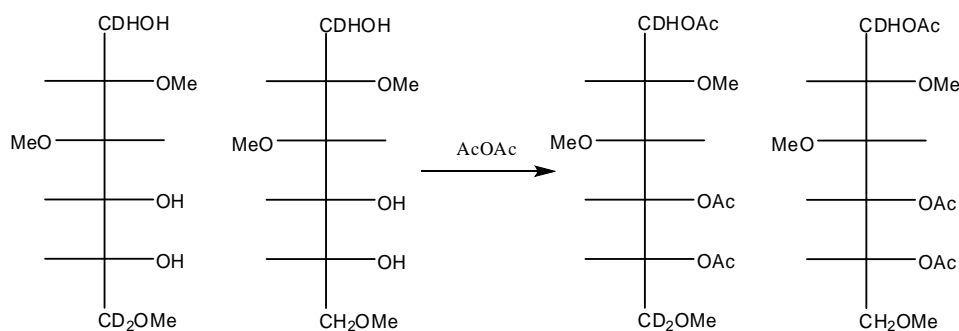
1. Den hydrolyserte prøven (fra metode 6.2.3) ble løst i 500 µl NH_3 og tilsatt 500 µl nylaget NaBD_4 -løsning
2. Prøven ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt, og videre inkubert i 1 time ved 60 °C.
3. Overskudd av reduktant ble fjernet ved å tilsette 3 x 50 µl iseddik.
4. Prøven ble tørket med nitrogen gass.
5. 2,5 ml eddiksyre i metanol ble tilsatt prøven, som videre ble tørket med nitrogen gass.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. For å fjerne borsyre ble 2,5 ml metanol tilsatt prøven, som videre ble tørket med nitrogen gass.
8. Punkt 7 ble gjentatt.

6.2.5 Acetylering

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp:

De delvis metylerte alditolene fra reduseringen acetyleres med eddiksyreanhydrid for å gi delvis metylerte alditol acetalen (DMAA) som kan analyseres med GC-MS. Retensjonstiden og massespekteret til hvert DMAA brukes sammen med kjente standarder for å identifisere monosakkaridenheten og bindingsmønsteret. Arealet under toppene på kromatogrammet kan brukes til kvantifisering.



Figur 6-8: Acetylering med eddiksyreanhydrid før GC-MS (Inngjerdingen 2000).

Utstyr:

- Ultralydbad: Bransonic 220
- SMI rør (blå)
- Brand Transferpettor pipette, 200 µl
- Finnpipette, 200-1000 µl
- Whirlimixer (Fisons)
- Sentrifuge: Multifuge 4KR (Heraeus Sepatech)
speed: 1000 g, tid: 3 min
- Supelcorør (4 ml) med teflonbelagt skrukork

Reagenser:

- 1-metylimidazol (aq) (Sigma)
- Eddiksyreanhydrid (Merck)
- Diklormetan (DCM) (Merck)
- Vannfri metanol (Merck)

Prosedyre:

1. Alt glassutstyr ble syrevasket (metode 5.2.10).
2. Den reduserte prøven (fra metode 6.2.4) ble acetykert ved å tilsette 200 µl 1-metylimidazol fulgt av 2 ml eddiksyreanhydrid.
3. Prøven ble blandet godt, eventuelt sonikert for å løse opp krystallene og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter.

4. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved å tilsette 10 ml vann. Prøven ble blandet godt og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter.
5. De delvis metylerte sukrene ble ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan. Det ble blandet godt og sentrifugert mellom hver ekstraksjon.
6. DCM-ekstraktene ble samlet opp, og tilbakevasket med 2 x 5 ml vann.
7. Diklormetanfasen ble overført til et supelco-rør og tørket med nitrogen gass.
8. Prøven ble løst i 50 µl vannfri metanol, og analysert med GC-MS (metode 6.2.6).

6.2.6 GC-MS

GC-MS ble utført av Finn Tønnesen ved avdeling for farmasøytisk kjemi.

Prinsipp:

(Bjergaard og Rassmussen 2004)

GC-MS er den beste metoden for separasjon og kvantifisering av DMAA (delvis metylerte alditol acetal). Et massespekter er svært karakteristisk og gir nyttig strukturinformasjon om stoffene, og massespektre for DMAA er godt dokumentert for alle bindingsmønstre og for alle kjente sukre.

I et massespekter ioniseres stoffene ved at de blir bombardert av en elektronstråle under vakuum. Molekylene ioniseres og brytes ned i mindre deler som kalles fragmenter. Massen til de ioniserte molekylene og eventuelle fragmenter bestemmes ved at de først separeres etter deres masse/ladningsforhold, og deretter detekteres av en detektor.

Utstyr:

- GC: 8000 series (Fisons)
- Detektor: MS MD800 (Fisons)
- Injektor: Splitt (1:10)
- Kolonne: Factor four kolonne, VF-Ims (upolar)

Lengde: 30 m

Indre diameter: 0,25 mm

Filmtykkelse: 0,25 µm

Betingelser:

- Gassflow: 1 ml/min
- Injektortemperatur: 250 °C
- Temperaturområde: 80 – 280 °C
- Temperaturprogram:

20°C/min	0,5 °C/min	30 °C/min
80 °C	170 °C	200 °C
5 min		25 min

6.3 Biologisk aktivitet

6.3.1 Komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstesten ble utført på Folkehelseinstituttet med veiledning av professor Terje Michaelsen.

(Michaelsen et al. 2000)

Prinsipp:

Komplementfikseringstesten er basert på graden av hemolyse av antistoffsensibiliserte saue-erytrocytter (SRBC). Komplementfiksering kan skyldes forbruk av komplement (komplement aktivering) eller interaksjoner med enkelte komplementfaktorer slik at disse hemmes eller inaktiveres. Erytrocytter fra sau sensibiliseres først med antistoff fra kanin mot erytrocyttene. Polysakkaridene i prøven får reagere med komplement før blodcellene blir tilsatt, og dersom polysakkaridene hemmer eller aktiverer komplement, vil hemolyse av blodcellene avta. Positiv aktivitet i testen gir hemming av lyse. Planteekstrakter kan påvirke komplementsystemet via den klassiske og/eller den alternative aktiveringsveien. Påvirkning via lektin veien er foreløpig ikke beskrevet.

Polysakkarid fraksjonen PMII er isolert fra blader fra *Plantago Major* L., og brukes som positiv kontroll. Blader fra *Plantago Major* L. har lenge blitt brukt i tradisjonell medisin som sårhelende middel, og den sårhelende effekten kan skyldes at PMII aktiverer komplement både via den klassiske og alternative veien.

Utstyr:

- Whirlimixer (Fisons)
- Finnpiquette, 40-200 µl
- Finnpiquette, 200-1000 µl
- Multipipette, 40-200 µl
- Varmeskap (37 °C) med risteplate (memmert)
- Sentrifuge: Megafuge 3.OR (Heraeus Sepatech)
speed: 800g, tid: 5 min, temp: 20 °C
- Flatbunnet immunoplate (nunc)
- Mikrotiterplate, 96 brønner med rund bunn (nunc)
- Microplate reader (Thermo Max)

Reagenser:

- Veronal/BSA buffer: Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30 %) og 0,02 % Natriumazid (10 %).
- 0,9 % NaCl (Merck)
- Antistoff: Virion 9020 Amboceptor fortynnet 1:10 i veronal buffer
- Saueblod: Hvit 131, 11.10.2007
- Komplementkilde: serum fra ECG (humant)
- Standard: *Plantago major* L. fraksjon II (PMII) (1 mg/ml).

Prosedyre:**A. Vasking av saueblodceller før sensibilisering:**

1. En mengde blod ble tatt ut avhengig av antall prøver (ca 100 µl per plate), og overført til 10 ml reagensglass.
2. Blodet ble vasket 2 ganger med 0,9 % NaCl og 1 gang med Veronal/BSA buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert, og vaskevannet pipetert av.

B. Sensibilisering av saueblodceller:

1. 15 µl Virion 9020 Amboceptor, 60 µl pakkeblodceller og 5,925 ml veronal/BSA buffer ble inkubert med resting i 30 minutter ved 37 °C.
2. Løsningen ble vasket 2 ganger med 0,9 % NaCl og 1 gang med Veronal/BSA buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert, og vaskevannet pipettert av.
3. For å lage en 1 % løsning av blodceller, ble blodet fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA buffer.

C. Fortynning av prøver og standard:

1. 1 mg innveid prøve ble løst i 1 ml veronal/BSA buffer slik at stamløsningkonsentrasjonen ble 1 mg/ml.
2. En 4-folds fortynningsrekke med 6 fortynninger av hver prøve ble laget som vist i tabell 6-1.

Rør nr.	Kons. µg/ml	
1	500	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra stamløsning.
2	125	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør 1.
3	31,25	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør 2.
4	7,81	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør 3.
5	1,95	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør 4.
6	0,49	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør 5.

Tabell 6-1: En 4-folds fortynningsrekke for hvert rør.

D. Titreringskurve for komplementkilden:

Nytt blod er vanskeligere å hemolisere enn gammelt, og det trengs derfor mer komplement for å ødelegge nytt blod. Når blodet blir eldre tåler blodcellene mindre på grunn av at cellemembranen blir svakere.

1. 4 brønner i en mikrotiterplate med runde bunner ble tilsatt 100 µl destillert vann, og 24 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA buffer (4 brønner per fortynning).

2. Det ble laget en fortynningsserie av komplement i buffer som vist i tabell 6-2, og 50 µl av hver fortynning ble tilsatt brønnene med veronal/BSA buffer.
3. Platen ble dekt med en bred, blank tape slik at ikke noe fordampet, og satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
4. 50 µl 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn, og inkubert videre ved risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 800g.
6. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate.
7. Platen ble sentrifugert for å fjerne eventuell luft som ble dannet under overføringen.
8. Absorbansen ble målt ved 405 nm på Microplate Reader.
9. Fortynningen 1:55 gav 50 % lyse av SRBC og ble brukt til komplementfikseringstesten.

Komplement:buffer	Komplement (µl)	Buffer (µl)
1:30	10	290
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990

Tabell 6-2: Titreringskurve for komplementkilden

E. Testing av prøvematerialet:

1. 50 µl av hver fortynning av prøven med 2 paralleller av hver ble tilsatt hver brønn i en mikrotiterplate med runde bunner (96 brønner).
2. Som 100 % lysekontroll ble det benyttet 4 paralleller med 100 µl destillert vann, og som kontroll ble det benyttet 4 paralleller med 50 µl veronal/BSA buffer.
3. Komplementet ble tatt opp av fryseren og fortynnet 1:55 i samsvar med titreringskurven for komplementet.
4. 50 µl av det fortynnete komplementet ble raskt tilsatt hver brønn, unntatt 100 % lysekontroll brønnene.

5. Platen ble dekt med en bred, blank tape slik at ikke noe fordampet, og satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. 50 µl 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn, og inkubert videre ved risting i 30 minutter ved 37 °C.
7. Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 800g.
8. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate.
9. Platen ble sentrifugert for å fjerne eventuell luft som ble dannet under overføringen.
10. Absorbansen ble målt ved 405 nm på Microplate Reader.

F. Beregning av lyseringsgrad:

Lyseringsgrad = hvor mye komplement som i seg selv ødelegger systemet.

(Anbefalt lyseringsgrad er ca 50 %).

Lyseringsgrad = (Abs. kontroll/Abs. vann) x 100 %

% hemming fra ekstraktet = ((Abs. kontroll – Abs. prøve)/Abs. kontroll) x 100 %

6.3.2 Mikrosomforsøk med Midazolam

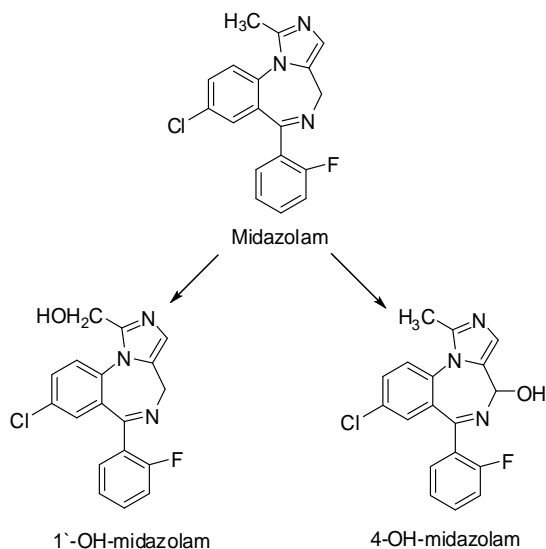
Mikrosomforsøket ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap med veiledning av Hege Christensen og Siri Johannesen.

(Postvoll 2006, Nikolic 2007)

Prinsipp:

Midazolam er en basisk og lipofil komponent som metaboliseres via CYP3A-enzymet til den aktive metabolitten 1'-hydrokso-midazolam (1'-OH-MDZ) og den inaktive sekundære metabolitten 4-hydrokso-midazolam (4-OH-MDZ). Midazolam er mye brukt som CYP3A-modellsubstrat fordi metabolismen nesten utelukkende skjer via CYP3A-enzymet. I denne testen måles % hemming av midazolammetabolismen i forhold til en kontrollprøve. Analyse

av de hydroksylerte metabolittene av midazolam ble utført på LC-MS med diazepam som intern standard for å korrigere for eventuelle variasjoner under kjøringen.



Figur 6-9: Metabolisme av midazolam via CYP3A-enzymet (Nikolic 2007).

Utstyr:

- Vannbad med rister: KQ606 (Citenco Ltd)
- Wirlmikser: MS2 Minishaker (IKA)
- Knust is
- Glass rør, 5ml

Reagenser:

- Prøveløsning/hemmer: 1mg/ml
- Bufferløsning: - Tris- H_2SO_4 (200 mM) (Sigma-Aldrich)
 - MgSO_4 (20 mM) (Merck)
 - NADPH (10 mM) (Sigma-Aldrich)
- Mobilfase A: - NH_3 25 %
 - Konsentrert HCOOH
 - Innebyttet vann
- Modellsubstrat: 20 μM Midazolam løst i bufferløsning

- Mikrosomer: Insekt CYP-3A4+b5 xenosomer fortynnet 1:64 i Lise Madsen Buffer (BD Gentest)
- Etylacetat (Merck)
- 44 nM Diazepam (Diakonhjemmet) i acetonitril (ACN) (Merck)

Prosedyre:

1. 100 µl prøveløsning ble tilsatt hvert sitt reagensrør.
2. Prøver løst i metanol ble dampet av ved hjelp av nitrogen gass, og reløst i 149 µl bufferløsning og 22 µl midazolam.
3. Kontrollprøve ble laget ved å tilsette 149 µl bufferløsning og 22 µl midazolam til et reagensrør uten prøveløsning.
4. Rørene ble preinkubert i 5 minutter på vannbad ved 37 °C.
5. Mikrosomene ble varmet på vannbad i et par minutter før tilsetning til rørene.
6. 50 µl mikrosom ble tilsatt hvert rør med et halvt minuts forskyvning, og inkubert i 7,5 minutter.
7. Reaksjonen ble stoppet med 220 µl iskald etylacetat.
8. Det øverste sjiktet ble pipettert av.
9. Punkt 7 og 8 ble gjentatt 2 ganger.
10. Prøvene ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av nitrogen gass.
11. Prøvene ble reløst i 50 µl ACN med Diazepam og 74 µl mobilfase A, blandet godt og overført til små glassrør.
12. Analyse av hydroksylerte midazolam metabolitter ble utført ved hjelp av LC-MS.

* For prøver løst i buffer ble det tilsatt 13 µl tris-buffer, 5 µl MgSO₄ og 30 µl NADPH istedenfor 149 µl bufferløsning i punkt 4.

LC-MS apparatur og betingelser

LC-MS består av et HPLC-system for separasjon av analytter og et massespektrometer som detektor. Metabolittene 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ har samme masse/ladningsforhold, og det var derfor nødvendig å separere stoffene kromatografisk. De hydroksylerte metabolittene

ble eluert med en gradient mobilfase bestående av mobilfase A og mobilfase B (Postvoll 2006).

Væskekromatograf: Shimadzu

Detektor: MS

Kolonne: Inertsil C8, 50 * 3 mm, 5 µM part. Str.

Flow: 0,5 ml/min

Injiseringvolum: 10,0 µl

Mobil fase gradient: mobilfase A + mobilfase B

Mobilfase A	
NH3 25 %	4,035 ml
Kons. HCOOH	2,125 ml
Ionebyttet vann	1 l

Mobilfase B	
ACN	950 ml
MeOH	50 ml

6.3.3 Test for antimikrobiell aktivitet

(Madigan et al. 2003)

Prinsipp:

Kirby-Bauer metoden er en vanlig brukt agar diffusjons prosedyre som brukes for å måle antimikrobiell aktivitet. En bakteriekultur spres utover agaroverflaten, og filterpapir med kjent konsentrasjon av prøvematerialet plasseres på overflaten. Etter inkubering måles hemningssonene rundt filterpapirene, og sammenlignes med kjente standarder. Det brukes forskjellig medium for sopp og bakterier.

Utstyr:

- Membran filter: Millex[®] GP filter 0,22 µm (Millipore)
- Sprøyte: BD plastic, 10ml
- Høstepinner
- Filterpapir: BBLTM Blank Paper Discs, diameter 6 med mer
- Utstansingsrør, diameter 9 mm

- Reagensrør med skrukork, 40 ml
- Pasteurpipetter
- Varmeskap: Functionline (Heraeus instruments)

Reagenser:

- Prøveløsning: 20 mg/ml
- Muller hinton medium (for bakterier)
- Sabouraud medium (for sopp)
- 0,9 % NaCl (sterilfiltrert) (Braun)
- Mc Farland standard nr 2: 0,2 ml 1 % bariumklorid
9,8 ml 1 % svovelsyre
- Positiv kontroll: Kloramfenikol 0,1 mg/ml (*B. subtilis*, *K. rhizophilia*)(Sigma)
Gentamicin 0,2 mg/ml (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) (Sigma)
Sulconazol 0,5 mg/ml (*C. albicans*) (Sigma)
- Negativ kontroll: Metanol (Merck)

Mikroorganisme	Type	ATCC nr
<i>Bacillus subtilis</i>	G+	6633
<i>Eschericia coli</i>	G-	25922
<i>Kocurina rhizophilia</i>	G+	9341
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G-	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	25923
<i>Candida albicans</i>	Sopp	10231

Prosedyre:

1. Aseptisk arbeidsteknikk ble benyttet.
2. Utstyret ble autoklavert i varmeskap ved 120 °C i 1 døgn.
3. For utsåing av bakteriene ble en Oxoid-loop fuktet på en 37 °C varm agarskal før mikroorganismene ble strøket ut.
4. Skålene ble inkubert i 24 timer for bakterier og 48 timer for sopp.
5. 9 g NaCl ble løst i 1 liter destillert vann og sterilfiltrert.
6. Noen kolonier med bakterier eller sopp ble suspendert i 2 ml sterilt fysiologisk saltvann slik at tettheten tilsvarte Mc. Farland standard nr.2.

7. Fra denne løsningen ble det overført 120 µl til 25 ml sterilt fysiologisk saltvann, og blandet godt.
8. 2 ml av inokulatet ble overført til agarskålen, og vendt på slik at hele skålen ble fuktet. Skålen ble vendt på skrå slik at overskuddet kunne fjernes.
9. Skålen ble stående i ca. 15 minutter med lokket delvis på til overflaten var tørr.
10. For prøver løst i metanol ble et filterpapir fuktet med 50 µl prøveløsning og plassert på agarskålen.
11. En lapp til negativ kontroll ble fuktet med metanol, og plassert på agarskålen.
12. For prøver løst i vann ble et utstansingsrør benyttet for å lage hull i agaren, og 100 µl prøveløsning ble applisert i hullene.
13. Skålene ble satt i romtemperatur (bakterier) eller kjøleskap (sopp) i nøyaktig 1 time før de ble satt til inkubering i varmeskap.
14. Hemningssonene ble avlest med linjal etter 1 døgn (bakterier) og 2-3 døgn (sopp).

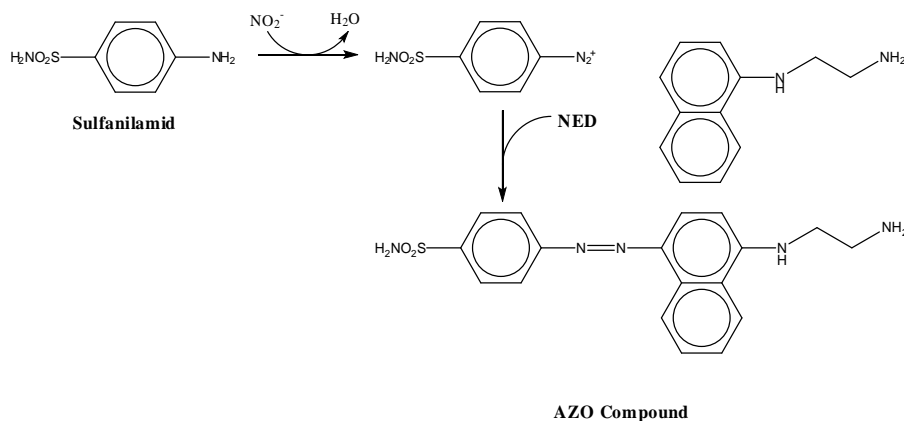
6.3.4 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Utført av Parakashtha Ghildyal ved Universitetet i Oslo, avdeling for anatomi, 2007.

(Promega Corporation 2005)

Prinsipp:

Griess reagenssystemet måler mengde nitritt (NO_2^-) som er ett av to primære nedbrytningsprodukter av nitritt oksid (NO). Makrofager skiller ut NO ved aktivering, og bidrar til å aktivere immunsystemet. Griess reagenssystemet baseres på den kjemiske reaksjonen vist i figur...hvor sulfanilamid og N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) reagerer med nitritt i surt miljø, og danner en Azo forbindelse. Azo farger løsningen rosa, og absorbansen avleses ved 540 nm. Laveste deteksjonsgrense av nitritt er 2,5 µM.



Figur 6-10: Kjemiske reaksjoner involvert i måling av NO_2^- ved å bruke Griess reagessystemet (Promega Corporation 2005).

Utstyr:

- Celleteller: Coulter Counter
- Sentrifuge: Beckman Rotanta 460R
- Mikrotiterplate, 96 brønner med flat bunn, V bunn og rund bunn (nunc)
- Absorbansmåler: Titertek Multiskan

Reagenser:

- Griess-reagens A: 1 % Sulfanilamid (Sigma S-9251)
- Griess-reagens B: 0,1 % N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) (Sigma N-9125)
- 2,5 % fosforsyre
- Dyrkningsmedium: RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin og 5×10^{-5} M mercaptoetanol
- Cellelinje: R2-makrofager derivert fra rottemakrofager
- NaCl (aq) (isoton)

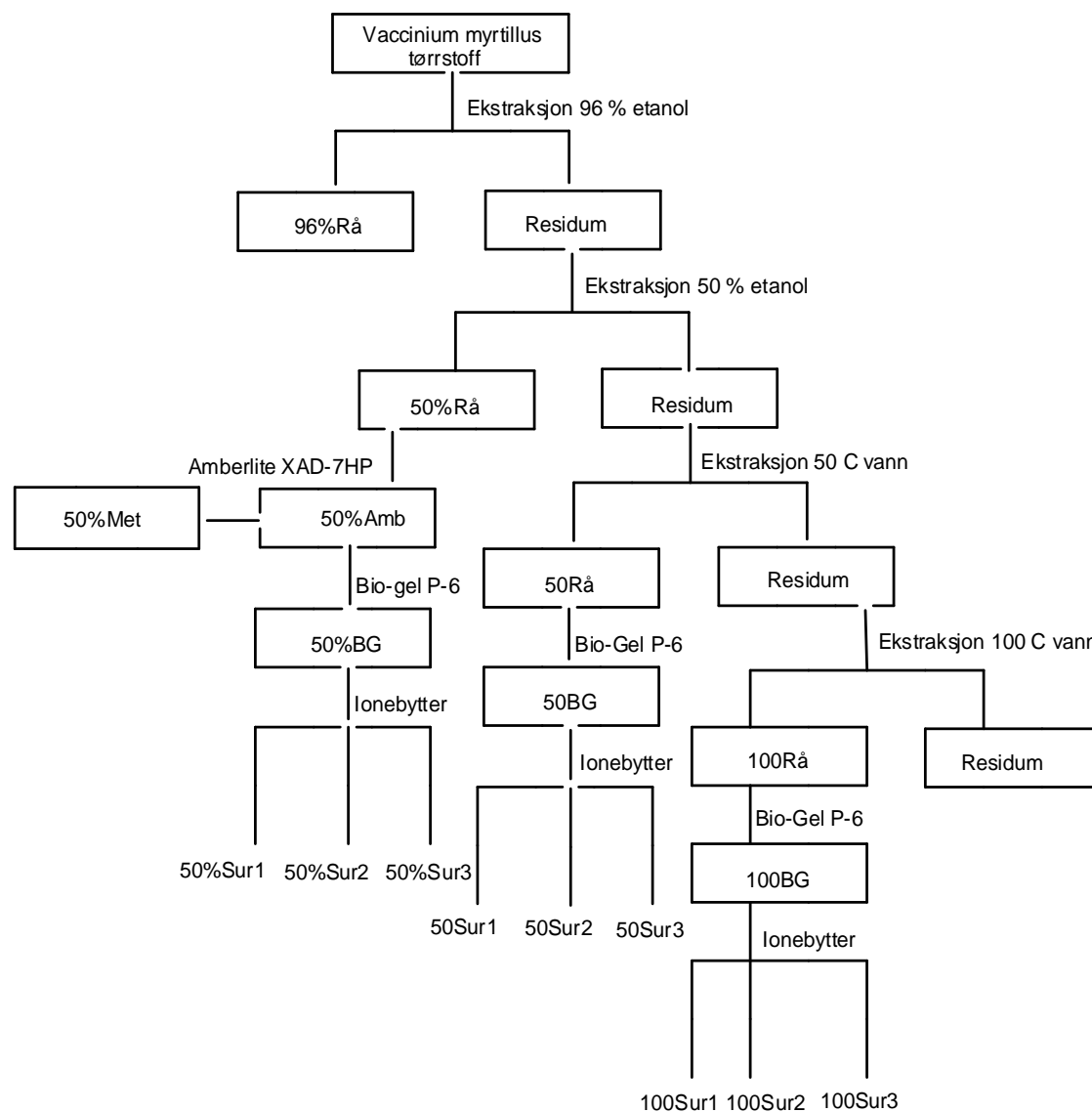
Prosedyre:

1. Makrofager ble høstet fra cellekultur.
2. 20 μl celleduspensjon ble tilsatt 10 ml NaCl-løsning, og cellene ble deretter telt i en celleteller.
3. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 minutter, og resuspendert til 1×10^6 celler/ml i dyrkningsmedium.

4. Cellene ble stimulert i en flatbunnet mikrotiterplate, og 50 μ l celleduspensjon ble tilsatt hver brønn.
5. Det ble laget en fortynningsrekke med 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml og 0,1 μ g/ml av prøvene.
6. 5 μ l prøve ble tilsatt hver brønn, og for hver fortynning ble det laget 2 paralleller. Som positiv kontroll ble 2 paralleller med 100 ng/ml LPS benyttet, og som negativ kontroll ble rent medium benyttet.
7. Cellene ble inkubert over natten ved 37 °C.
8. 100 μ l av supernatanten ble overført til en V-bunnet mikrotiterplate, og sentrifugert ved 1300 rpm i 2 minutter.
9. 50 μ l av supernatanten ble overført til en rundbundet mikrotiterplate.
10. For å lage en standardkurve ble det laget en fortynningsrekke av NaNO₃ med 100 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1,25 μ M og 0 μ M.
11. 50 μ l Griess-reagent A ble tilsatt, og prøvene satt til henstand i 10 minutter ved romtemperatur i mørke.
12. 50 μ l Griess-reagent B ble tilsatt, og absorbansen målt ved 540 nm.

7. Resultater og diskusjon

7.1 Fraksjonering og isolering av polysakkarider



Figur 7-1: Flytdiagram for fraksjonering og isolering av polysakkarider fra *Vaccinium myrtillus*.

7.1.1 Ekstraksjon

Utgangspunktet for ekstraksjonen var tørkede blåbær kjøpt fra apotekproduksjon A/S. Bærene var ikke helt tørre inni og ble derfor ekstrahert først med diklormetan, og deretter med 96 %

etanol for å fjerne lavmolekylære og lipofile substanser fra bærene. De tørkede bærene ble pulverisert i en kvern.

De pulveriserte bærene ble videre ekstrahert med etanol 96 %, etanol 50 %, vann 50 °C og til slutt med vann 100 °C. Ekstraksjon av plantematerialet resulterte i tilsammen 4 fraksjoner; etanol 96 % rækstrakt (96%Rå), etanol 50 % rækstrakt (50%Rå), vann 50 °C rækstrakt (50Rå) og vann 100 °C rækstrakt (100Rå).

Alle ekstraktene, unntatt 96 % ekstraktet, ble videreført for fraksjonering og isolering på Bio-Gel P-6.

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Volum (ml)
96%Rå	79,65	2000
50%Rå	78,20	500
50Rå	9,80	400
100Rå	8,40	500

Tabell 7-1: Volum og konsentrasjon av ekstraktene.

7.1.2 Fraksjonering av 50 % etanolekstraktet på Amberlite XAD-7HP

Adsorpsjonskromatografi ved bruk av Amberlite XAD-7HP baseres på metode brukt for rensing av antocyaniner (Sirnes 2003).

50 % etanol rækstraktet inneholdt mye fargestoffer (antocyaniner), og disse ble isolert på Amberlite XAD-7HP for å lette videre fraksjonering på Bio-Gel P-6. 13 ml ekstrakt (tilsvarende ca. 1 g tørrstoff) ble applisert på kolonnen totalt 14 ganger. De aromatiske antocyanene skulle i teorien adsorberes til kolonnematerialet og ikke elueres ut før vasking med 0,1 % TFA i metanol. En del av de sterkt fargede forbindelsene ble derimot ikke adsorbent på kolonnen, og ble eluert ut sammen med polysakkaridene.

For å sjekke om de sterkt fargede forbindelsene gav utslag på fenol-svovelsyretesten (metode...), ble først 100 µl av hver fraksjon + 1200 µl destillert vann mikset godt, og 100 µl overført til en mikrotiterplate. Absorbansen ble målt ved 490 nm. De fargende forbindelsene viste seg å gi lite utslag på absorbansen, og ble ikke tatt hensyn til videre.

Fenol-svovelsyretesten ble brukt for å bestemme karbohydratinnholdet i eluatene, og på grunnlag av karbohydratprofilen ble eluatene slått sammen til 1 fraksjon, 50% Amb, som ble videreført for videre fraksjonering og isolering av ekstraktene på Bio-gel P-6.

Det ble i tillegg tatt vare på 1 eluat med metanol for senere biologisk testing.

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Volum (ml)
50% Amb	16,60	100
50% Met	0,76	200

Tabell 7-2: Volum og konsentrasjonen til fraksjonene etter rensing på Amberlite XAD-7HP.

7.1.3 Separasjon av lavmolekylære- og høymolekylære polysakkarider på Bio Gel P-6

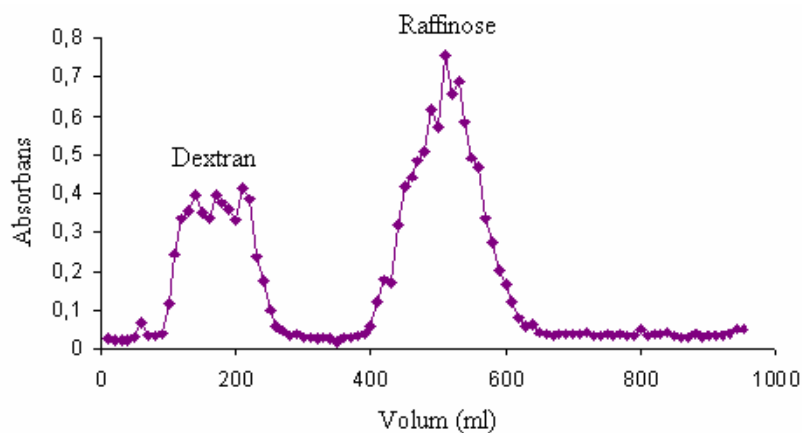
Bio-Gel separerer stoffer etter deres molekylvekt. Høymolekylære polysakkarider elueres ut først mens lavmolekylære forbindelser, som for eksempel fargestoffer og salter, elueres ut senere.

Denne metoden ble brukt for fraksjonering og isolering av 50 % etanolekstraktet etter fraksjonering på Amberlite XAD-7HP, og av 50 °C og 100 °C vannekstraktene.

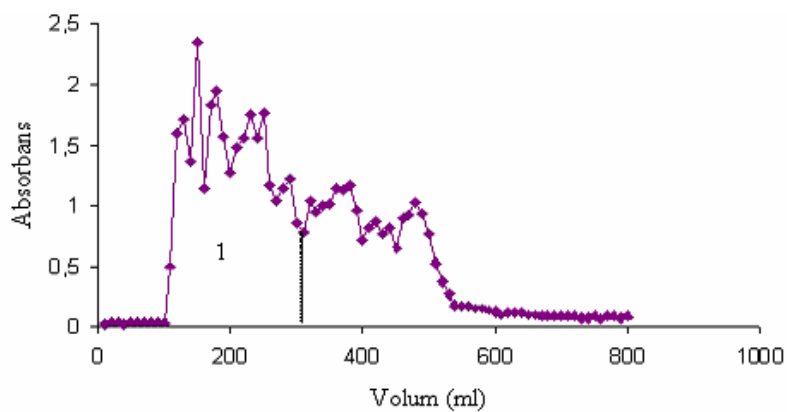
100 ml prøveløsning ble filtrert og applisert på kolonnen.

50 % etanolekstraktet etter fraksjonering på Amberlite XAD-7HP inneholdt fortsatt mye fargestoff, og mye av de fargede substansene festet seg permanent til Bio-Gel P-6 kolonnematerialet.

Dextran (Mw ~ 500.000) og Raffinose (Mw ~ 600) ble sammen brukt som standard for å se når høymolekylære og lavmolekylære polysakkaridene elueres ut (Figur: 7-2). På bakgrunn av karbohydratprofilen for standarden (figur: 7-2), ble de høymolekylære polysakkaridene slått sammen til 1 fraksjon (figur: 7-3).



Figur 7-2: Karbohydratprofil for standardløsningene Dextran (Mw ~ 500.000) og Raffinose (Mw ~ 600).



Figur 7-3: Karbohydratprofil for 50%BG.

Fraksjonering og isolering av alle råekstraktene på Bio-Gel P-6 resulterte i 3 høymolekylære fraksjoner, 50%BG, 50BG og 100BG, som ble videreført for videre fraksjonering og isolering på ANX Sepharose 4 Fast Flow ionebytter .

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Volum (ml)
50%BG	1,80	350
50BG	1,00	350
100BG	2,23	350

Tabell 7-3: Volum og konsentrasjon til de forskjellige fraksjonene etter gelfiltrering.

7.1.4 Separasjon av sure- og nøytrale polysakkarider på ANX Sepharose Fast Flow ionebytter.

De 3 høymolekylære fraksjonene fra gelfiltreringen ble separert videre på en ionebytterkolonne. 350 ml prøveløsning (tilsvarende ca. 500 mg tørrstoff) ble filtrert og applisert på kolonnen. Nøytrale polysakkarider ble eluert ut med destillert vann. Sure polysakkarider ble retardert på kolonnen fordi de var negativt ladet, og ble eluert ut etter økende surhetsgrad ved hjelp av en NaCl gradient fra 0-2 M. Ladede polysakkarider er ofte vist å ha biologisk aktivitet (Paulsen og Barsett 2005), og det var derfor ønskelig å gå videre med de sure polysakkaridene for videre biologisk undersøkelse. Karbohydratprofilen til de sure polysakkaridene ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten, og ut fra profilene ble eluatene delt opp i 3 sure fraksjoner (Sur1, Sur2 og Sur3). Fraksjonene ble dialysert og frysetørket.

Etter 0-2 M NaCl gardientelueringen ble kolonnen eluert med 500 ml 2 M NaCl i tilfelle noen av de mer ladede polysakkaridene satt igjen på kolonnen.

Videre fraksjonering og isolering av BG-fraksjonene på ionebytter resulterte i til sammen 9 sure fraksjoner; 50%Sur1, 50%Sur2, 50%Sur3, 50Sur1, 50Sur2, 50Sur3, 100Sur1, 100Sur2, og 100Sur3.

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Volum (ml)
50%Sur1	1,17	70
50%Sur2	2,59	130
50%Sur3	0,92	150
50Sur1	0,25	280
50Sur2	1,49	240
50Sur3	0,50	210
100Sur1	0,15	270
100Sur2	0,98	260
100Sur3	0,41	220

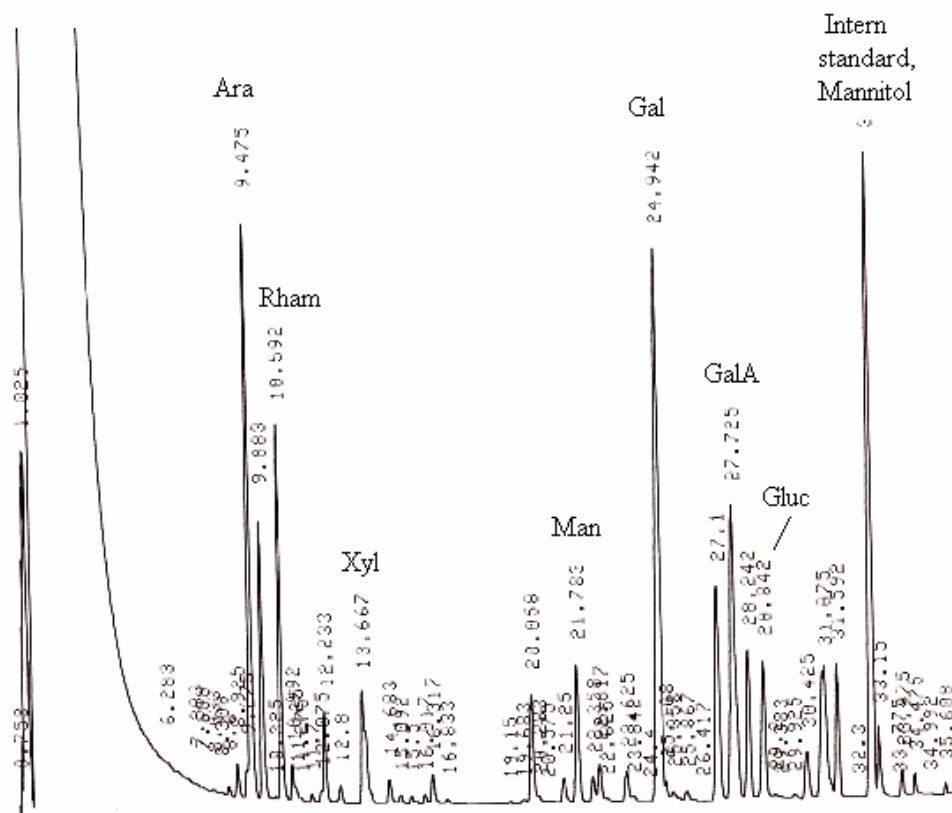
Tabell 7-4: Volum og konsentrasjon til de forskjellige fraksjonene etter ionebytter og dialyse.

7.2 Karbohydratanalyse

7.2.1 Monosakkaridbestemmelse

Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av monosakkaridsammensetningen av alle fraksjonene ble utført ved metanolyse etterfulgt av TMS-derivatisering og GC-analyse.

Beregning av mengde monosakkarider i prøven baserer seg på standardkurver for hvert monosakkarid med mannitol som intern standard.



Figur 7-4: Monosakkaridbestemmelse av fraksjon 50%BG. Mannitol ble brukt som intern standard.

	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	4-O-Me-GlcA	GalA	% karbohyd. I prøven
96%Rå	1,2	-	0,9	0,6	1,2	51,0	-	3,9	100
50%Rå	14,1	3,4	3,3	3,2	13,6	22,5	21,7	18,1	80,8
50%Amb	11,5	5,5	6,5	4,9	21,2	13,3	10,4	26,8	70,7
50%Met	38,8	2,4	5,7	-	1,8	31,4	10,1	9,7	55,2
50%BG	17,2	7,2	1,5	5,5	27,4	6,8	2,2	32,1	100
50%Sur1	16,9	1,4	2,4	11,6	45,6	6,7	0,7	14,7	100
50%Sur2	14,6	5,5	-	5,1	24,4	3,0	-	47,5	97,0
50%Sur3	14,0	16,9	1,2	1,9	19,4	4,4	1,7	40,4	63,6
50Rå	10,0	3,6	5,5	2,3	15,1	9,0	1,0	53,5	54,5
50BG	9,6	3,4	8,2	2,4	14,9	10,1	2,1	49,3	100
50Sur1	15,1	2,9	10,5	5,6	23,0	8,8	0,8	33,2	85,4
50Sur2	8,5	4,8	0,9	6,4	11,1	2,5	-	65,8	84,6
50Sur3	9,1	6,7	1,8	10,1	15,1	8,4	-	48,7	54,3
100Rå	17,0	4,4	4,2	6,3	17,2	12,4	2,2	36,4	100
100BG	19,0	4,8	5,9	7,5	19,4	11,3	0,6	31,5	100
100Sur1	15,6	3,4	12,6	13,4	28,3	16,5	0,5	9,7	100
100Sur2	22,9	7,8	2,6	1,4	19,4	4,1	0,4	41,3	100
100Sur3	8,5	7,6	1,4	0,9	12,4	5,7	1,2	62,3	77,3

Tabell 7-5: Monosakkariddammensetningen til de forskjellige fraksjonene.

Tabell 7-5 viser at monosakkaridsammensetningen til fraksjonene er typisk for pektiner. De fleste fraksjonene inneholder mye GalA som kan tyde på kjeder med homogalakturenan. Det høye innholdet av arabinose og galaktose indikerer tilstedeværelse av arabinogalaktaner som representerer forgreninger i fraksjonene. Fraksjonene inneholder i tillegg mye rhamnose, som antyder tilstedeværelse av rhamnogalakturenan.

Glukuronsyre og fucose ble ikke detektert i noen av fraksjonene.

De fleste fraksjonene inneholder små mengder av naturlig metylert glukuronsyre (4-O-Me-GlcA).

Fraksjonene inneholder xylose, mannose og glukose i varierende grad.

Total mengde karbohydrater i fraksjonene varierer fra 54 – 100 %.

7.2.2 Bestemmelse av bindingsforhold

På bakgrunn av komplementfikserende aktivitet (resultat 7.3.1) ble 4 sure fraksjoner (50%Sur1, 50%Sur3, 50Sur1 og 100Sur1) valgt ut for videre strukturbestemmelse. Dette var de mest aktive fraksjonene i komplementtesten. Bindingsforholdet mellom monosakkaridene ble bestemt etter karboksylsyreduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse (metodde 6.2). Arealet under hver topp på kromatogrammet ble brukt til å bestemme mengdeforholdet mellom de ulike bindingstypene. Resultatene ble justert i forhold til monosakkaridmengdene funnet ved metanolyse.

Terminal Gal og GalA har lik retensjonstid ved GC-MS. Galaktose kan skilles fra galakturonsyre ved å se på forholdet mellom fragmentene 205 og 207 i massespekteret. Det samme gjelder for terminal Glc og GlcA.

1,4-Gal og 1,4-GalA kan skilles ved å se på forholdet mellom fragmentene 233 og 235 i massespekteret, og det samme gjelder for 1,4-Glc og 1,4-GlcA.

Dette forklares ved at esterifiserte og frie karboksylsyregrupper på galakturonsyreenhetene må reduseres før metylering. Esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte med NaBD₄ til deutererte primære alkoholder, mens frie uronsyrer først må aktiveres med carbodiimid. Det dannes 6,6-dideuteriosukre som kan skilles fra nøytrale sukre i GC-MS fordi de vil ha massefragmenter med molekylvekt (M+2).

	Bindingstype	50%Sur1	50%Sur3	50Sur1	100Sur1
Arabinose	Terminal	9,0	8,5	6,6	4,8
	1,2 og 1,3	2,9	-	1,9	2,1
	1,4 el 1,5	4,7	5,5	4,5	5,9
	1,3,4 el 1,3,5	-	-	2,1	2,9
	1,2,4 el 1,2,5	0,4	-	0,1	0,1
Rhamnose	Terminal	-	-	-	0,2
	1,2	-	9,4	2,0	2,8
	1,3	-	-	-	0,2
	1,2,4	-	7,5	0,9	0,2
Xylose	Terminal	-	1,2	0,4	3,4
	1,4	2,4	-	9,8	8,2
	1,2,4	-	-	0,4	1,2
Mannose	1,6	-	-	-	2,9
	1,4 og 1,6	-	-	-	10,5
Galaktose	Terminal	-	4,5	0,2	0,6
	1,4	26,6	8,9	17,0	20,0
	1,3	1,5	3,9	3,1	1,3
	1,6	-	-	-	0,2
	1,3,4	3,2	2,1	1,5	1,8
	1,2,4	1,7	-	-	2,3
	1,3,6	12,8	-	1,4	2,4
Glukose	Terminal	-	-	-	0,5
	1,4	6,8	4,4	7,2	10,9
	1,6	-	-	-	0,8
	1,4,6	-	-	1,7	4,4
Glukuronsyre	Terminal	-	1,7	0,8	0,5
Galakturonsyre	Terminal	-	1,6	1,5	0,3
	1,4	-	38,8	32,0	9,4

Tabell 7-6: Bindingsforhold mellom monosakkaridene i fraksjonene 50%Sur1, 50%Sur3, 50Sur1 og 100Sur1.

Verdiene er angitt i prosent av total karbohydratmengde i prøven.

Fraksjonene 50%Sur3 og 50Sur1 inneholder mye 1,4-bundet GalA, noe som kan tyde på tilstedeværelse av pektin hvor 1,4-bundet GalA inngår i en homogalakturenan hovedkjede, eller sammen med 1,2-bundet Rha inngår i en rhamnogalakturenan hovedkjede. 50%Sur3 inneholder videre mye 1,2,4-bundet Rha, som viser at rhamnose er forgrenet, som er typisk for rhamnogalakturenan I.

Ifølge metanolysesultatet skulle 50%Sur1 inneholde 14 % GalA. En mulig forklaring på at GalA ikke detekteres i metyleringsanalysen kan være at uronsyrene ikke har blitt redusert, eller at galakturonan kjeden ikke har blitt hydrolysert.

Ingen av fraksjonene inneholder 1,3,4-bundet GalA som er vanlig å se for rhamnogalakturonan II (RG-II), og det tyder på at RG-II ikke er tilstede i fraksjonene.

Alle fraksjonene inneholder relativt store mengder terminal arabinose som kan tyde på en stor grad av forgrening. Bindingene mellom arabinoseenheter er hovedsakelig 1,4 eller 1,5 som indikerer at kjeder av arabinaner er tilstede. 50Sur1 og 100Sur1 inneholder i tillegg noe 1,3,4 eller 1,3,5-bundet Ara som viser forgreningspunkter.

1,4-bundet Gal er vanlig å se i AG-I med sidekjeder av arabinaner vanligvis bundet til C-3 på galaktose enheten. Alle fraksjonene inneholder mye 1,4-bundet Gal (ca.20 %) i tillegg til noe 1,3 og 1,3,5-bundet Ara og det tyder på at AG-I er tilstede i alle fraksjonene. Forekomst av 1,3-Gal i tillegg til forgrenede Gal-enheter sammen med terminal og 1,5 bundet Ara er typisk for AG-II, og forekommer i alle fraksjonene, men i mindre grad enn AG-I. Dette stemmer med Yariv-resultatene (resultat 7.2.3), som indikere at alle fraksjonene inneholder noe AG-II.

AG-I og AG-II kan begge være 1,4-bundet til rhamnose på RG-I hovedkjeden.

Både terminal og 1,4-bundet xylose er tilstede. Ingen forgreningspunkter av GalA er detektert og xylose må derfor være bundet til andre deler av pektinet eller være polysakkarider av annen type. Terminal og 1,4-bundet xylose i kombinasjon med 1,4 og 1,4,6 glukose er typisk for xyloglukaner (en type hemicellulose) (Ebringerová 2006). 1,4-bundet glukose er tilstede i alle fraksjonene, og 50Sur1 og 100Sur1 inneholder i tillegg noe 1,4,6-bundet glukose som viser forgreningspunkter. Dette indikerer tilstedeværelse av xyloglukaner. Hilz et al. (2005) brukte andre ekstraksjonsbetingelser, men fant i sine studier også lange kjeder med 1,4 og 1,4,6-bundet glukose, som sammen med terminale sukre indikerte på tilstedeværelse av xyloglukaner (Hilz et al. 2005).

100SurI inneholder både 1,4 og 1,6-bundet mannose som kan tyde på tilstedeværelse av galaktomannaner (Ebringerová 2006).

Metyleringsanalysen av 50%Sur1, 50Sur1 og 100Sur1 viser tilstedeværelse av terminal GlcA. Metanolyseresultatene viste ikke noe GlcA, men viste 4-O-Me-GlcA. Dette kan tyde på at det er 4-O-Me-GlcA som sitter terminalt.

Av de sure fraksjonene undersøkt her viste 100Sur1 høyest komplementfikserende aktivitet (resultat 7.3.1). 100Sur1 inneholder lite 1,2,4-Rha forgreningspunkter men mye arabinose, galaktose og terminale monosakkarider. Dette kan tyde på tilstedeværelse av få, men komplekse, hårete regioner som kan være viktige for aktivering av komplementsystemet.

7.2.3 Identifisering av type II arabinogalaktan strukturer med Yariv reagens.

Yariv reagens støpt inn i en agargel binder seg spesifikt til komponenter som inneholder type II arabinogalaktan strukturer, og en positiv reaksjon kan identifiseres med en rød sirkel rundt brønnene der prøvene har blitt applisert.

Alle fraksjonene ble testet, med unntak av 96%Rå og fraksjonene etter rensing på Amberlite XAD-7HP.



Figur 7-5: Resultater fra felling med Yariv reagens. Arabisk gummi ble brukt som standard referanse, og det ble applisert henholdsvis 2, 4 og 6 μ l.

Venstre: 50 % fraksjonene (fra toppen; standard, 50%Rå, 50%BG, 50%Sur1, 50%Sur2, 50%Sur3).

Midten: 50 °C fraksjonene (fra toppen; standard, 50Rå, 50BG, 50Sur1, 50Sur2, 50Sur3).

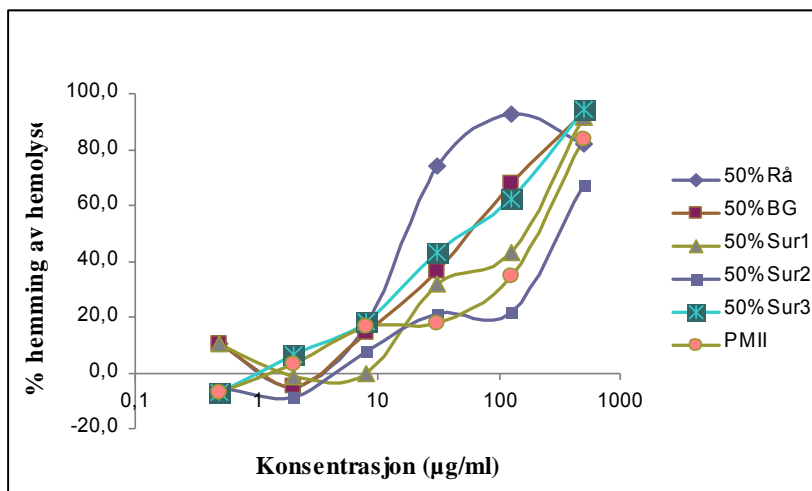
Høyre: 100 °C fraksjonene (fra toppen; standard, 100Rå, 100BG, 100Sur1, 100Sur2, 100Sur3).

Alle fraksjonene feller med Yariv reagens, men i varierende grad. Noen av de laveste konsentrasjonene viser ikke felling. Dette tyder likevel på at alle fraksjonene inneholder noe AG-II polysakkarider. Det stemmer med monosakkaridsammensetningen til fraksjonene som indikerer tilstedeværelse av arabinogalaktantype-polysakkarider. 50%Sur1, 50%Sur1 og 100%Sur1 utpeker seg ved å gi betydelige fellingsreaksjoner og viser derfor høyest innhold av AG-II. Disse fraksjonene viser også høy komplementfikserende aktivitet.

7.3 Biologisk aktivitet

7.3.1 Komplementfiksering

Alle fraksjonene, unntatt 50% Amb og 50% Met, ble testet for komplementfikserende aktivitet (metode 7.3.1). Aktiviteten ble målt i prosent hemming av hemolyse, og ICH_{50} er den laveste konsentrasjonen av prøven som gir 50 % hemming av hemolyse. Testen skiller ikke mellom aktivering og hemming av komplementsystemet. PMII ble brukt som positiv kontroll.

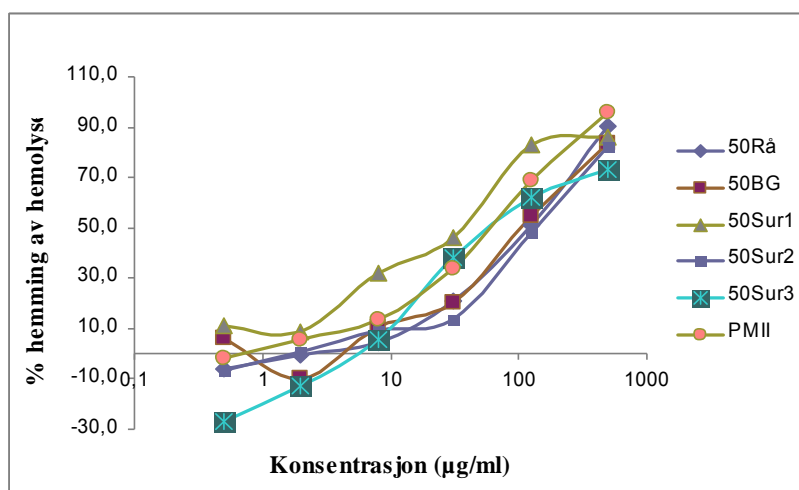


Figur 7-6: Komplementfikserende aktivitet for 50 % fraksjonene. PMII er positiv kontroll.

Fraksjon	ICH ₅₀ (µg/ml)	ICH ₅₀ Rel.
50%Rå	17,4	0,1
50%BG	56,9	0,3
50%Sur1	153,2	0,8
50%Sur2	297,1	1,5
50%Sur3	74,6	0,4
PMII	192,5	1,0

Tabell 7-7: ICH₅₀ og ICH₅₀ Rel. verdier for 50 % fraksjonene.

Tabell 7-7 viser ICH₅₀-verdiene for alle 50 % fraksjonene sammenlignet med PMII. 50%Rå har lavest ICH₅₀-verdi, noe som tilsvarer høyest aktivitet. Etter fraksjonering på Bio-Gel blir ICH₅₀ verdien høyere, og det kan se ut som noen av komponentene som er viktig for aktiviteten har blitt fjernet. Alle fraksjonene unntatt 50%Sur2 har bedre aktivitet enn PMII..

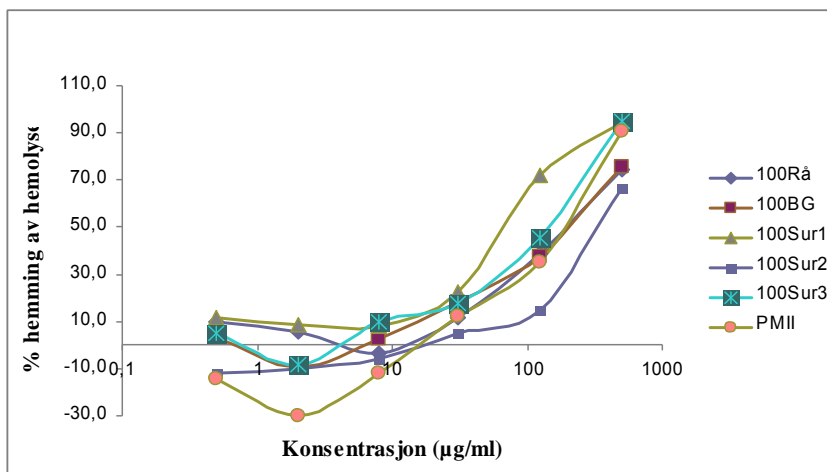


Figur 7-7: Komplementfikserende aktivitet for 50 °C fraksjonene. PMII er positiv kontroll.

Fraksjon	ICH ₅₀ (µg/ml)	ICH ₅₀ Rel.
50Rå	119,3	2,0
50BG	103,6	1,8
50Sur1	35,7	0,6
50Sur2	135,6	2,3
50Sur3	61,2	1,0
PMII	59,1	1,0

Tabell 7-8: ICH₅₀ og ICH₅₀ Rel. verdier for 50 °C fraksjonene.

50Sur1 har lavest ICH_{50} , og er den eneste fraksjonen som mer aktiv enn PMII. 50Sur3 er like aktiv som PMII. Aktiviteten til fraksjonen øker etter fraksjonering på ionebytter, med unntak av 50Sur2, og komponenter som ikke er viktige for aktiviteten kan ha blitt fjernet.

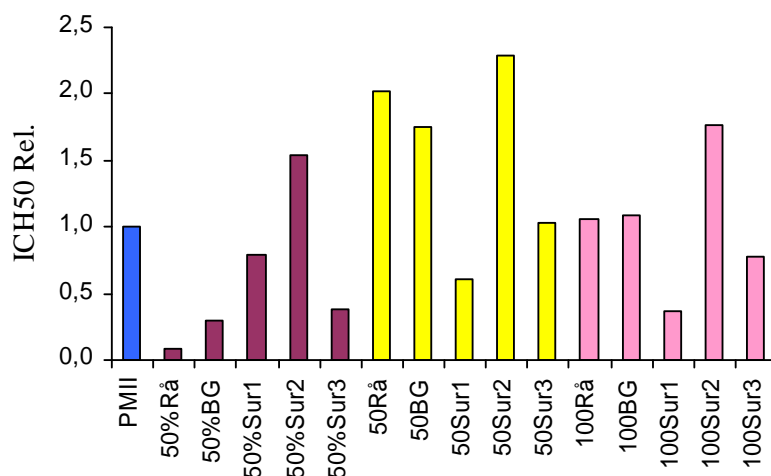


Figur 7-8: Komplementfikserende aktivitet for 100 °C fraksjonene.

Fraksjon	ICH_{50} (ug/ml)	ICH_{50} Rel.
100Rå	193,0	1,1
100BG	196,8	1,1
100Sur1	67,5	0,4
100Sur2	322,3	1,8
100Sur3	141,5	0,8
PMII	181,9	1,0

Tabell 7-9: ICH_{50} og ICH_{50} Rel. verdier for 100 °C fraksjonene.

100Sur1 og 100Sur3 har lavest ICH_{50} verdi, og er mer aktive enn PMII. Etter fraksjonering på ionebytter blir fraksjonene mer aktive, unntatt 100Sur2, og komponenter som ikke er viktige for aktiviteten har trolig blitt fjernet.



Figur 7-9: ICH₅₀ verdiene for fraksjonene relatert til ICH₅₀ verdiene for PMII.

Aktiviteten til fraksjonene er doseavhengig, og alle fraksjonene gir 50 % hemming ved konsentrasjoner brukt i testen.

Ut fra figur 7-9 er det tydelig at 50 % råkstraktet har en sterk komplementfikserende aktivitet, og er mer enn ti ganger så aktiv som PMII. Aktiviteten til fraksjonene øker etter rensing på ionebytter, med unntak av alle Sur2 fraksjonene som viser lavere aktivitet enn råkstraktene. Alle ionebytter fraksjonene inneholder mye GalA, rhamnose, arabinose og galaktose som indikerer tilstedeværelse av pektintype-polysakkarider som er forbundet med komplementfikserende aktivitet (Paulsen og Barsett 2005). Alle fraksjonene responderte også positivt med Yariv, som viser at AG-II er tilstede.

Tredimensjonal struktur kan i tillegg til monosakkaridsammensetningen være avgjørende for aktivisering av komplement, og kan være en mulig forklaring på hvorfor Sur1 og Sur3 fraksjonene viser høyere aktivitet enn Sur2 fraksjonene. Ikke alle pektintype-polymere har biologisk aktivitet, og det er her tydelig at noen spesifikke strukturelle aspekter ikke er tilstede. Flere typer plantepolysakkarider med forskjellige strukturer har vist seg å ha immunmodulerende aktivitet, og selv om det er hypoteser, er det ingen klare bevis på hvordan et polysakkarid må være strukturelt designet for å ha aktivitet.

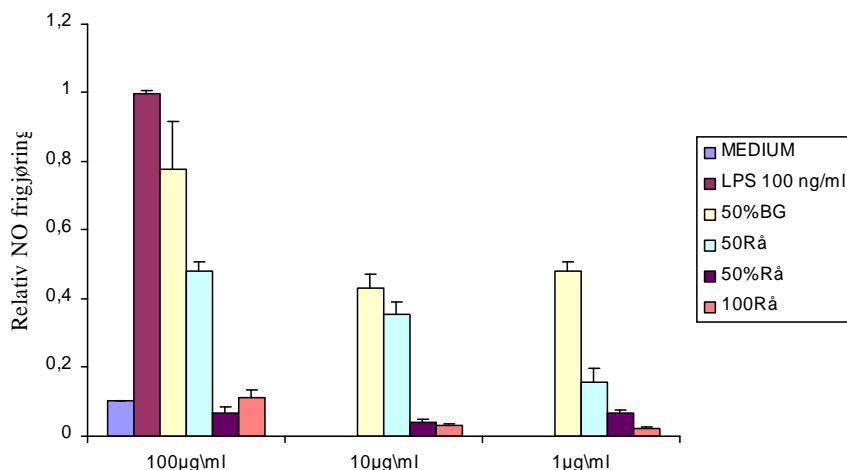
Det ble ikke utført videre strukturbestemmelse på Sur2 fraksjonene, noe som hadde vært interessant for å se nærmere på sammenhengen mellom struktur og aktivitet.

Ingen tidligere studier er utført på *V. myrtillus* mht antikomplementær aktivitet. Dette forsøket ble kun utført en gang, men burde vært utført flere ganger for å se om resultatene er reproduserbare.

7.3.2 Makrofagaktivering

Denne testen ble utført av Parakashtha Ghildyal ved avdeling for anatomi, UiO, 2007.

50%Rå, 50%BG, 50Rå og 100Rå fraksjonene ble i forskjellige konsentrasjoner (100µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml) undersøkt om de kunne aktivere frigjøring av NO fra makrofager. Polysakkarider har tidligere vist seg å kunne øke aktiviteten til makrofager (Togola 2008), og når makrofager aktiveres skiller de ut NO som spontant omdannes til nitritt (NO₂⁻). Nitritt kan detekteres kolometrisk ved hjelp av Griess-reagenssystemet (metode 6.3.4). Lipopolysakkarid (LPS) er en potent makrofag aktivator, og ble benyttet som positiv kontroll, mens medium ble benyttet som negativ kontroll.



Figur 7-10: Måling av relativ NO-frigjøring fra makrofager. LPS ble benyttet som positiv kontroll, og medium negativ kontroll.

Figur 7-10 viser at alle fraksjonene induserer en doseavhengig frigjøring av NO, med unntak av 50Rå som ser ut til å være mer aktiv ved 1 µg/ml enn ved 10 µg/ml. 50%Rå fraksjonen har mye lavere aktivitet enn 50%BG fraksjonen, og det kan tyde på de aktive komponentene

har blitt isolert ved fraksjonering på Bio-Gel P-6. Både 50%Rå og 100Rå har mindre aktivitet enn negativ kontroll, og kan derfor ikke regnes som aktive.

Denne testen ble kun utført en gang, og det var kun råeksraktene og 50%BG fraksjonen som ble testet. Det hadde vært interessant og utført flere forsøk på flere fraksjoner for å se om det er de høymolekylære polysakkaridene som er aktive.

7.3.3 Blåbær som CYP3A4 hemmer – Et pilotprosjekt

Forsøket er basert på en standardprosedyre utviklet av Lillian Wåge Postvoll (Postvoll 2006).

Metabolismestudier av midazolam ble utført i insekt-mikrosomer hvor det humane genet for CYP3A-enzymet var transfektert inn.

Høymolekylære polysakkarider kan i denne metoden ikke injiseres på LC-MS. Midazolam og metabolittene ble isolert ved å riste prøven 2 ganger med etylacetat. Midazolam og metabolittene er fettløselige og vil gå over i etylacetatfasen, mens sukrene er vannløselige og vil bli i vannfasen. Iskald etylacetat stopper også metabolismen av midazolam ved å felle proteinene og dermed ødelegge cellemembranen til mikrosomene. Diazepam ble brukt som intern standard for å korrigere for variasjoner under kjøringen på LC-MS, og tilsatt til slutt i prosedyren for å unngå at den metaboliseres. Prøvenes evne til å hemme CYP3A4 beskrives som prosentvis hemming av midazolammetabolismen.

Hemmere	1'-OH/DIA	4-OH/DIA
50%Met	100 %	100 %
50%Rå	89 %	90 %
96%Rå	88 %	88 %
50Rå	43 %	36 %
50%BG	22 %	42 %
100Rå	16 %	-17 %

Tabell 7-10: % hemming av metabolisme av midazolam.

Midazolam metaboliseres til 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ, og det ble dannet mindre mengder av 4-OH-MDZ sammenlignet med 1'-OH-MDZ. Dette stemmer med tidligere in-vitro-studier (Postvoll 2006).

Pilotforsøket med hemming av midazolammetabolismen ved tilsetning av forskjellige fraksjoner fra *V. myrtillus* viser interessante resultater. 96%Rå, 50%Rå og 50%Met viser sterkere hemming enn 50Rå og 100Rå fraksjonene. 50%Rå fraksjonen viser sterkere hemming enn 50%BG fraksjonen som kan tyde på at aktive komponentene har blitt fjernet ved fraksjonering på Bio-Gel P-6. Det kan se ut som om det er de lavmolekylære forbindelsene som er aktive CYP3A4-hemmere.

Det ble bare utført ett forsøk, og det må gjøres flere forsøk for å kunne underbygge påstanden om at blåbær hemmer aktiviteten til CYP3A4-enzym, og kan føre til økt konsentrasjon av legemidler som er substrater for samme enzym.

7.3.4 Antimikrobiell aktivitet

Alle rækstraktene og fraksjonene etter fraksjonering på Bio-Gel P-6 ble testet for antibakteriell aktivitet ved agar-diffusjon (metode 6.3.3). Det ble utført 2 paralleller av 96%Rå og 50%Met fraksjonene, da disse inneholdt lavmolekylære og fenoliske komponenter, og var trolig mest aktive. Positiv kontroll (0,1 mg/ml Kloramfenikol) for *B. subtilis* og *K. rhizophilia* ble ved en feil utelatt.

Mikroorganisme	Positiv kontr.	Positiv kontr.								
	Rå	BG	96%Rå	50%Rå	50%BG	50%Met	50Rå	50BG	100Rå	100BG
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	1,5	1,5	1,5	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	2,9	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. rhizophilia</i>	-	-	-	-	-	1,0	r.v	r.v	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	2,5	2,5	-	r.v	r.v	1,1	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	2,9	2,9	-	1,2	-	0,9	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	2,0	2,2	-	1,5	-	1,0	-	-	-	-

Tabell 7-11: Hemningssoner (diametere målt i cm) observert for de forskjellige fraksjonene. r.v = redusert vekst, - = ingen hemming observert.

50%Met viser størst hemming som ventet, i motsetning til 96%Rå som ikke viser noe hemming. 50%Rå, 50%BG og 50%Met har alle hemmende effekt på *B. subtilis*, men på grunn av utelatt positiv kontroll har man ingen sammenligningsgrunnlag. Det samme gjelder for 50%Met sin hemming av *K. rhizophilia*. Ingen av fraksjonene viser hemming av *E. coli*.

Både 50%Met og 50%Rå fraksjonene viser begge hemming av *P. aeruginosa*, *S.aureus* og *C.albicans*, men mindre enn positiv kontroll.

50%BG viser mindre hemming enn 50%Rå noe som indikerer at aktive komponenter har blitt fjernet ved fraksjonering på Bio-Gel P-6 . Dette kan tyde på at det er de lavmolekylære komponentene som har mest effekt.

Forsøket kan tyde på at komponenter i blåbær kan ha en viss antimikrobiell aktivitet. Både 50%Met og 50%Rå fraksjonene inneholdt mye fargestoff, og det kan se ut som det er antocyaninene i blåbær som sørger for aktiviteten. Dette stemmer med tidligere studier utført av Nohynek et al. (2006).

Dette forsøket ble kun utført 1 gang, og flere forsøk må utføres for å kunne si noe sikkert om den antimikrobielle aktiviteten til blåbær.

8. Konklusjon

Målet med oppgaven var å isolere forskjellige fraksjoner på grunnlag av størrelse og ladning, og utføre kjemisk og biologisk karakterisering av disse.

Pulverisert plantemateriale ble ekstrahert med etanol 96 %, 50 %, vann 50 °C og vann 100 °C, og ved hjelp av adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7HP, gelfiltrering med Bio-Gel P-6 og ionebytterkromatografi med ANX Sepharose Fast Flow, ble polysakkarider i blåbær isolert etter størrelse og ladning.

De fleste fraksjonene isolert ved ionebytterkromatografi viste en sterk komplementfikserende aktivitet, og var mer aktive enn standard PMIL.

Analyse av monosakkaridsammensetningen viste at fraksjonene inneholdt mye GalA, Gal, Ara og Rha som er typisk for pektiner. På grunn av høy komplementfikserende aktivitet, ble 4 sure fraksjoner (50%Sur1, 50%Sur2, 50Sur1 og 100Sur1) valgt ut for videre strukturbestemmelse, og undersøkelse av bindingstype viste at alle fraksjonene inneholdt mye 1,4-bundet galaktose i tillegg til noe 1,3 og 1,3,5-bundet Ara som er vanlig å se i AG-I. Tilstedeværelse av 1,3-Gal i tillegg til forgrenede Gal-enheter og terminal og 1,5-bundet Ara viste at AG-II også er tilstede, noe som stemmer med at alle fraksjonene responderte positivt på Yariv-reagens.

50%BG og 50BG induserte doseavhengig frigjøring av NO fra makrofager som tyder på at polysakkarider i blåbær kan ha makrofagstimulerende egenskaper.

50%Met og 50%Rå viste begge hemming eller redusert vekst av *S.eureus*, *C. albicans* og *P. aeruginosa* som kan tyde på at lavmolekylære komponenter (antocyaniner) i blåbær har antimikrobiell effekt.

50%Met fraksjonen viste 100 % hemming av midazolammetabolismen, noe som tyder på at lavmolekylære komponenter i blåbær kan være potensielle hemmere av CYP3A4, og føre til økt konsentrasjon av legemidler som er substrater av samme enzym.

Den biologiske aktiviteten til blåbær har til nå vært assosiert med lavmolekylære forbindelser. Høymolekylære polysakkarider fra blåbær ser her ut til å ha positiv effekt på aktivering av både komplementsystemet og makrofager, og den biologiske aktiviteten til blåbær kan ikke lenger kun assosieres med lavmolekylære forbindelser.

Kildeliste

Amersham Pharmacia Biotech, PD-10 Desalting columns. Instruksjonshefte.

Amersham Pharmacia Biotech, ANX Sepharose 4 Fast Flow. Instruksjonshefte.

Bio-Rad Laboratories, Bio-Gel[®] P. Instruksjonshefte.

Biosupplies, YARIV REAGENTS. Faktablad.

Blomhoff, R. (2004) Antioksidanter og oksidativt stress. *Tidsskriftet Norske Lægeforening* **124** (12), 1643-5.

Burdulis, D., Ivanauskas, L., Dirse, V., Kazlauskas, S., Razukas, A. (2007) Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina* **43** (12), 971-977.

Canter, P.H., Ernst, E. (2004) Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for Night Vision – A Systematic Review of Placebo-Controlled Trials. *Survey Of Ophthalmology* **49** (1), 38-50.

Chambers, R.E., Clamp, J.R. (1971) An Assessment of Methanolysis and Other Factors Used in the Analysis of Carbohydrate-Containing materials. *Biochemical Journal* **125** (4), 1009-18

Ciucanu, I. (2006) Per-O-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **576**, 147-155.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356

Ebringerová, A. (2006) Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* **232**, 1-12.

E/S/C/O/P MONOGRAPHS. (2003) Thieme, second edition, 345-350.

Greibrokk, T.E., Lundanes, E., Rasmussen. (1998) Kromatografi. Universitetsforlaget, 3. utgave.

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. (2004) Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, 217-218.

Hilz, H., Bakx, E.J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (2005) Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries – characterisation in berries, juice and press cake. *Carbohydrate Polymers* **59**, 477-488.

Hilz, H., Williams, P., Doco, T., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (2006) The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is present as a dimer in pectic populations of bilberries and black currants in muro and in juice. *Carbohydrate Polymers* **65**, 521-528

Holst, G.J.V, Clarke, A. (1985) Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion. *Analytical Biochemistry* **148**, 446-450.

Inngjerdingen, K. (2000) Sårhelende planter i Mali. A: Videre studier over *Glinus Oppositifolus*. B: Feltarbeid i Dogonland og Sikasso. *Hovedfagsoppgave i farmakognosi*. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Izydorczyk, M. (2005) Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. I Food carbohydrates - chemistry, physical properties and applications (ed. Cui, S.W.) Taylor & Francis group.

Kalt, W., Dufour, D. (1997) Health Functionality of Blueberries. *Hort Technology* **7** (3), 216-221.

Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Paur, I., Bøhn, S.K., Sandvik, L., Blomhoff, R. (2007) Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor- B Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults. *The Journal of Nutrition* **137**, 1951-1954.

Kim, J-B., Carpita, N.C. (1992) Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides During Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant physiology* **98**, 646-653.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003) Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, tenth edition, 807-808.

Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Høgåsen, K., Paulsen, B.S. (2000) Interaction Between Human Complement and Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* **52**, 483-490.

Michaelsen, T. Komplementssystemet. Forelesning i FRM 4030, 05.03.07

Morazzoni, P., Bombardelli, E. (1996) *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia* **67** (1), 3-29.

Myskja, A. (2006) Blåbær-smakfull antioksidant, Noas Ark, 2 opplag, 27-28.

Nikolic, N. (2007) CYP3A5 mediated metabolism of midazolam in vitro. *Hovedfagsoppgave i farmakologi*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Nohynek, L.J., Alakomi, H.L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Caldentey, K.M.O., Pimiä, R.H.P. (2006) Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. *Nutrition and cancer* **54** (1), 18-32.

Norsk legemiddelhåndbok. (2007) Interaksjoner.
<http://www.legemiddelhandboka.no>, hentet 28.04.08.

Parham, P. (2005) The Immune System. Garland Science, second edition.

Paulsen, B.S., Barsett, H. (2005) Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science* **186**, 69-101.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. (2004) Legemiddelanalyse, Fagbokforlaget, 193-211.

Postvoll, L.W. (2006) Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro - Utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter. *Hovedfagsoppgave i farmakologi*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Promega Corporation, Griess Reagent System. I Technical Bulletin INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G2930, Promega Corporation: Madison, WI.

Scheller, H.V. (2007) Plant Biochemistry. Universitetet i København.
<http://www.uk.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>, hentet 02.04.08

Schepetkin, I.A., Quinn, M.T. (2006) Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* **6**, 317-333.

Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (2002) The chemical structure of pectins. I Pektins and their Manipulation (ed. Seymour, G.B., Knox, J.P.) Blackwell Publishing.

Sirnes, E. (2003) FARGESTOFFER I TROPISKE PLANTER - Analyse av antocyaner i *Callistemon citrinus*, *Phyllanthus ovalifolia* og *Jacrandra mimosifolia*. *Hovedfagsoppgave i organisk kjemi*. Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen.

Skard, O. (2003) Ville Vekster – røtter i kulturhistorien. Landbruksforlaget, 106-109.

Sveaas, A. (2007) Immunmodulerende polysakkarider isolert fra *Biophytum petersianum* Klotzsch. Etnofarmakologiske studier i Mali. *Hovedfagsoppgave i farmakognosi*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Togola, A., Inngjerdingen, M., Diallo, D., Barsett, H., Rolstad, B., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. (2008) Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation. *Journal of Ethnopharmacology* **115**, 423-431.

Faarlund, T., Sunding, P. (1992) Flora for Norge og Nord-Europa. Teknologisk Forlag, Norsk utgave, 294.

Wischmann, F. (1993) Ville planter i Norge. Forlaget DET BESTE, 2. utgave, 193-194.